

Einfluß des Immunsuppressivums Ovalicin
auf den Stoffwechsel ribosomaler RNA
in S49.1 Lymphomzellen

Hannes Diersch

**Dissertation der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig Maximilians Universität München**

**Einfluß des Immunsuppressivums Ovalicin auf den
Stoffwechsel ribosomaler RNA in S49.1 Lymphomzellen**

von

Hannes Diersch

aus

München

1986

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 12 (3) der Promotionsordnung vom 5. 3. 1981 von Herrn Prof. Dr. G. R. Hartmann betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne erlaubte Hilfe angefertigt.

München, am 1. Sept. 1986

Hanno Stiel

Dissertation, eingereicht am 1. Sept. 1986

1. Berichterstatter: Prof. Dr. G. R. Hartmann
2. Berichterstatter: Prof. Dr. E. L. Winnacker

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Nov. 1986

Die vorliegende Arbeit wurde vom Oktober 1982 bis August 1986 auf Anregung und unter Leitung von Herrn Professor Dr. Guido Hartmann am Institut für Biochemie der Ludwig Maximilians-Universität München ausgeführt.

Herrn P.D. Dr. Bernd-Joachim Benecke (Bochum), Frau Prof. Dr. Ingrid Grummt (Würzburg), Herrn Prof. Dr. Asen Hadjiolov (Sofia), Herrn Dr. Martin Lipp (München) und Herrn P.D. Dr. Reinhard Lührmann (Berlin) danke ich für wertvolle Diskussionen und Ratschläge.

Herrn Dr. Reinhard Lührmann (Berlin) danke ich weiter für die Überlassung von URNAs.

Herrn Dr. Martin Lipp (München) habe ich für die Überlassung RNasefreier DNase zu danken.

Nicht zuletzt gilt mein Dank allen nicht namentlich genannten Kolleginnen und Kollegen, die meine Arbeit - auf welche Weise auch immer - unterstützt haben.

INHALT

Einleitung	1
Erstkapitel	11
Zweites Kapitel	11
Drittes Kapitel	17
Viertes Kapitel	19
Fünftes Kapitel	21
Sechstes Kapitel	23
Meinen Eltern	25
Neuntes Kapitel	27
Zehntes Kapitel	29
Elftes Kapitel	31
Zwölftes Kapitel	33
Dreizehntes Kapitel	35
Vierzehntes Kapitel	37
Fünfzehntes Kapitel	39
Sechzehntes Kapitel	41
Sechzehntes Kapitel	43
Sechzehntes Kapitel	45
Sechzehntes Kapitel	47
Sechzehntes Kapitel	49
Sechzehntes Kapitel	51

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Zusammenfassung	1
Einleitung	3
Problemstellung	11
Material & Methoden	13
Geräte	13
Enzyme	13
Ribonukleinsäuren	14
Chemikalien	14
Medien und Seren für die Zellkultur	15
Lösungen	17
Zellkultur	19
RNasefreie DNase	20
RNase Aktivität der DNase	20
DNase Aktivität	22
Vanadylribonukleosidkomplex	22
RNA Bestimmung	24
Bestimmung der Radioaktivität	25
Inkubation mit Ovalicin	25
Markierung mit [^3H]Methionin	26
Markierung mit [^3H]Uridin	27
Isolierung der Kern RNA	28
Isolierung cytoplasmatischer RNA	31

VIII

Gelelektrophorese	32
Agarose-Formaldehydgele	32
Acrylamid-Harnstoffgele	33
Gelelektrophoretische Analyse der RNAs	35
Zerschneiden der Gele	35
Zuordnung der RNA Banden	37
Zuordnung der radioaktiv markierten Banden	41
Fluorographie	41
Agarose-Formaldehydgele	42
Acrylamid-Harnstoffgele	42
Ergebnisse	45
Einfluß von Ovalicin auf	
das Wachstum von S49.1 Zellen	45
den RNA Gehalt	47
die RNA Syntheserate	49
die Methylierungsgeschwindigkeit ribosomaler RNA	52
die Aufnahme von Uridin	56
die Aufnahme von Methionin	58
das Prozessieren ribosomaler RNA	59
kleine RNAs	75
den Transport ribosomaler RNA in das Cytoplasma	87
die Methylierung ribosomaler RNA	113
Diskussion	125
Versuchsbedingungen	125
Wahl der Konzentration des Ovalicins	125
Wahl der Einwirkungsdauer von Ovalicin	125

RNA Gehalt der Zellkerne	126
Einbau radioaktiver Vorstufen in KernRNA	128
Aufnahme von Uridin	129
Synthese von UTP	130
RNA Synthese	131
RNA Synthese durch RNA Polymerase III	131
RNA Synthese durch RNA Polymerase II	131
RNA Synthese durch RNA Polymerase I	132
Prozessieren ribosomaler RNA	133
Die Möglichkeit des alternativen Prozessierens	136
Die Anhäufung ribosomaler RNA im Zellkern	140
Verzögerter Transport von 28S RNA in das Cytoplasma	141
Methylierung ribosomaler RNA	143
Verändertes Methylierungsmuster durch Ovalicin	146
Ovalicin als Immunsuppressivum	151
 Literatur	 153
 Abkürzungen	 165
 Verzeichnis der Abbildungen, Figuren und Tabellen	 167
 Lebenslauf	 171

ZUSAMMENFASSUNG

Der Einfluß des Immunsuppressivums Ovalicin auf den Stoffwechsel ribosomaler RNA wurde in S49.1 Lymphomzellen der Maus untersucht. Dazu wurde ribosomale RNA und deren VorläuferRNA aus Zellkernen und Cytoplasma isoliert und der Einbau radioaktiv markierter Vorstufen wie [methyl- ^3H]Methionin und [^3H]Uridin in Abhängigkeit von Ovalicin analysiert.

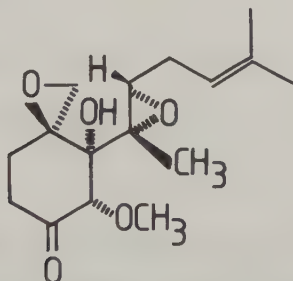
Ovalicin bewirkte nach 18 h Einwirkdauer in einer Konzentration von $2 \cdot 10^{-7}\text{M}$

- 1.) eine Reduzierung der RNA Synthese im Zellkern um 27%
- 2.) eine Hemmung des ersten Prozessierungsschrittes von 45S- zu 41S RNA
- 3.) eine Anhäufung von 32S, 28S- und 18S RNA im Zellkern
- 4.) einen verzögerten Transport von 28S RNA im Vergleich zu 18S RNA in das Cytoplasma
- 5.) eine Veränderung des Einbaumusters von [methyl- ^3H]-Methionin in die verschiedenen KernRNA Spezies im Vergleich zum Einbau von [^3H]Uridin

Ausgehend von Befund 5.) wird die Hypothese aufgestellt, daß Ovalicin das Methylierungsmuster ribosomaler VorläuferRNA verändert. Es wird diskutiert, daß dieses veränderte Methylierungsmuster die Anlagerung wichtiger Proteine an ribosomale VorläuferRNA im Nucleolus stören könnte. Damit ließen sich die Befunde 2.) bis 4.) erklären.

EINLEITUNG

Ovalicin ¹⁾ (4-Hydroxy-5-methoxy-4-[2-methyl-3-(3-methyl-2-butenyl)oxiranyl]-1-oxaspiro[2,5]oktan-6-on) ist ein Stoffwechselprodukt des Ascomyceten *Pseudeurotium ovalis* STOLK und wurde von Sigg & Weber (1968) erstmals aus dem Kulturfiltrat dieses Pilzes isoliert. Die gleichen Autoren klärten auch die Struktur dieser Verbindung auf (Sigg & Weber, 1968; Bollinger *et al.*, 1973).



Ovalicin

Es handelt sich um ein Diepoxid eines Sesquiterpens, einer weit verbreiteten Klasse von Naturstoffen. Ovalicin ist verwandt mit Fumagillin (McCorkindale & Sime, 1961; Turner & Tarbell, 1962; Birch & Hussain, 1969; Nozoe *et al.*, 1976), einem bereits länger bekannten Pilzmetaboliten aus dem Ascomyceten *Aspergillus fumigatus*.

¹⁾ zur Biosynthese von Ovalicin: Tanabe & Suzuki (1974); Cane & Levin (1975, 1976); Cane & King (1976); Cane & Buchwald (1977)
zur Totalsynthese von Ovalicin: Corey & Dittami (1985)

Unabhängig hiervon wurde etwa zur selben Zeit eine Verbindung aus dem Kulturfiltrat eines Pilzes der Gattung *Graphium* isoliert, die "Graphinon" genannt wurde (Sassa *et al.*, 1969).

Im Verlauf der Strukturaufklärung dieser Verbindung stellten Sassa *et al.* (1970) fest, daß Graphinon mit Ovalicin identisch ist. Graphinon stimuliert bereits in einer Konzentration von 0,1 ppm ($=0,1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, entsprechend $3\cdot 10^{-7}\text{M}$ bei einer rel. Molmasse von 296) die Keimung von Kopfsalatsamen (lettuce) in der Dunkelheit. Eine maximale Stimulierung wurde bei Konzentrationen zwischen 10 und 50 ppm (entsprechend $3\cdot 10^{-5}\text{M}$ und $2\cdot 10^{-4}\text{M}$) gemessen (Sassa *et al.*, 1969). Eine Hemmung des Wachstums von Kopfsalatsämlingen (lettuce) wurde erst bei Konzentrationen von über 25 ppm (entsprechend 10^{-4}M) beobachtet (Sassa *et al.*, 1969).

Interessant sind die immunsuppressiven Eigenschaften von Ovalicin, die im Tierexperiment jedoch erst bei höheren Wirkstoffkonzentrationen ($300 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ Körpergewicht) erreicht werden konnten (Lazáry & Stähelin, 1968). So mußten $600 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ Körpergewicht Ovalicin verabreicht werden, um in Mäusen die Antikörperbildung gegen Schafserythrocyten bis auf weniger als 1% zu unterdrücken (Lazáry & Stähelin, 1969; zitiert bei Hartmann *et al.*, 1978).

Überraschenderweise wurde jedoch gefunden, daß Ovalicin außerhalb des tierischen Organismus in Lymphocytenkulturen oder Lymphomzelllinien wesentlich wirksamer ist. So wurde die Proli-

feration mitogenstimulierter Lymphocyten oder die antigeninduzierte Bildung von Antikörpern schon bei Ovalicinkonzentrationen von 10^{-9}M bis 10^{-11}M gehemmt (Weiner, 1976; Hartmann *et al.*, 1978; Zimmermann & Hartmann, 1980). Die Zellteilung nichtlymphoider Zelllinien wird dagegen weniger stark beeinflusst (Hartmann *et al.*, 1978; Zimmermann, 1979). Ovalicin stellt damit - *in vitro* - ein außerordentlich wirksames Immunsuppressivum dar.

Ovalicin ist *in vivo* um mehrere Zehnerpotenzen weniger aktiv als *in vitro*. Dies könnte damit zusammenhängen, daß die Carboxylfunktion des Moleküls für die Wirkung der Droge essentiell ist. Die entsprechende 6-Hydroxyverbindung ist unwirksam (Weiner, 1976). Ovalicin könnte also durch Reduktion im Organismus (Leber) inaktiviert werden. Aufgrund des hydrophoben Charakters der Verbindung ist außerdem die Absorption der Droge im Fettgewebe denkbar.

Da Ovalicin *in vitro* in extrem niedrigen Konzentrationen seine Wirkung zeigt, kann ein definierter Angriffsort in der Zelle angenommen werden. Experimente zur Eingrenzung dieses Angriffsortes durch Hartmann *et al.* (1978), Zimmermann (1979) und Zimmermann & Hartmann (1980, 1981) zeigten, daß Ovalicin als erstes die RNA Synthese beeinflusst. In Übereinstimmung hiermit beobachtet man, daß der Ribosomengehalt von Lymphocyten in Gegenwart von Ovalicin reduziert ist. Da bekannt ist, daß ruhende Lymphocyten nach Stimulierung als einer der ersten Antworten den Gehalt ihrer Ribosomen vervielfachen (Kay *et al.*, 1969; Cooper & Gibson, 1971; Emerson, 1971; Sören &

Biberfeld, 1973), um proliferieren zu können, wäre durch diesen Mechanismus die klonale Expansion stimulierter Lymphocyten verhindert.

Zimmermann & Hartmann zeigten 1981, daß der Wirkort der Droge eng mit der Synthese ribosomaler RNA verbunden ist und stellten die Hypothese auf, daß Ovalicin das Prozessieren ribosomaler VorläuferRNA in die reifen rRNA Spezies beeinflusst.

Mehrere Arbeitsgruppen haben gezeigt, daß das Prozessieren ribosomaler RNA in Eukaryoten nach einem gemeinsamen, vielstufigen Prozeß abläuft (Übersichtsartikel: Maden, 1971; Wellauer & David, 1975; Perry, 1976; Hadjiolov & Nikolaev, 1976; Maden, 1976; Hadjiolov, 1980; Hadjiolov, 1985, S. 90-102).

Ribosomale RNA wird an ribosomaler DNA - der ribosomalen Transkriptionseinheit (Cory & Adams, 1977; Long & David, 1980; Goldman *et al.*, 1983; Hadjiolov, 1985, S. 5-53) - im Nucleolus von der eukaryotischen RNA Polymerase I in Form eines langen Vorläufermoleküls transkribiert. Dieses Molekül hat in Säugerzellen eine Sedimentationskonstante von 45S (Scherrer & Darnell, 1962; Scherrer *et al.*, 1963) und ist ca. 13 000 Nukleotide lang (Maden *et al.*, 1977). Es enthält die Sequenzen von 18S-, 5,8S-²⁾ und 28S rRNA als drei von vier RNA Bestandteilen eukaryotischer Ribosomen³⁾. Diese Bereiche sind durch Regionen voneinander getrennt, die mit "spacer" bezeichnet

²⁾ früher als 7S RNA oder 5,5S RNA bezeichnet

³⁾ Die Gene der 5S rRNA werden dagegen an einem anderen Genort von RNA Polymerase III im Nucleoplasma transkribiert

werden und die im Laufe des Prozessierens abgetrennt und abgebaut werden. Am 5' Ende befindet sich der "externe transkribierte spacer" (ETS), zwischen der 18S- und 28S rRNA Sequenz der "interne transkribierte spacer" (ITS). Dieser wird wiederum durch die Sequenz von 5,8S rRNA in zwei Teile - ITS₁ und ITS₂ - getrennt (Fig. 1).

Der erste Schritt des Prozessierens dieses 45S Primärtranskriptes ist das Abtrennen des externen transkribierten spacers an der Stelle, die in Fig. 1 mit "1" gekennzeichnet wurde. Die dadurch gebildete 41S RNA wird weiter an Position Nr. 2 unter Bildung von 18S RNA und 36S RNA geschnitten. Aus 36S RNA entsteht nach Abtrennen des internen transkribierten spacers ITS₁ an Position Nr. 3 32S RNA. Aus dieser entstehen schließlich 28S RNA und das 12S Vorläufermolekül (Bowman *et al.*, 1981; Dudov *et al.*, 1983; Hadjiolova *et al.*, 1984b) von 5,8S RNA. Diese wird schließlich nach Abtrennen des internen transkribierten spacers ITS₂ von 12S RNA durch Schnitt an der Stelle Nr. 5 gebildet. 5,8S RNA ist an 28S RNA wasserstoffbrückengebunden (Pene *et al.*, 1968; Pace *et al.*, 1977; Peters *et al.*, 1982; Walker *et al.*, 1982; Walker & Pace, 1983).

Dieses "klassische" Prozessierungsschema wurde erstmals für L-Zellen der Maus beschrieben (Perry & Kelley, 1972; Wellauer *et al.*, 1974) und galt lange Zeit als charakteristisch für diesen Zelltyp (siehe Bowman *et al.*, 1981).

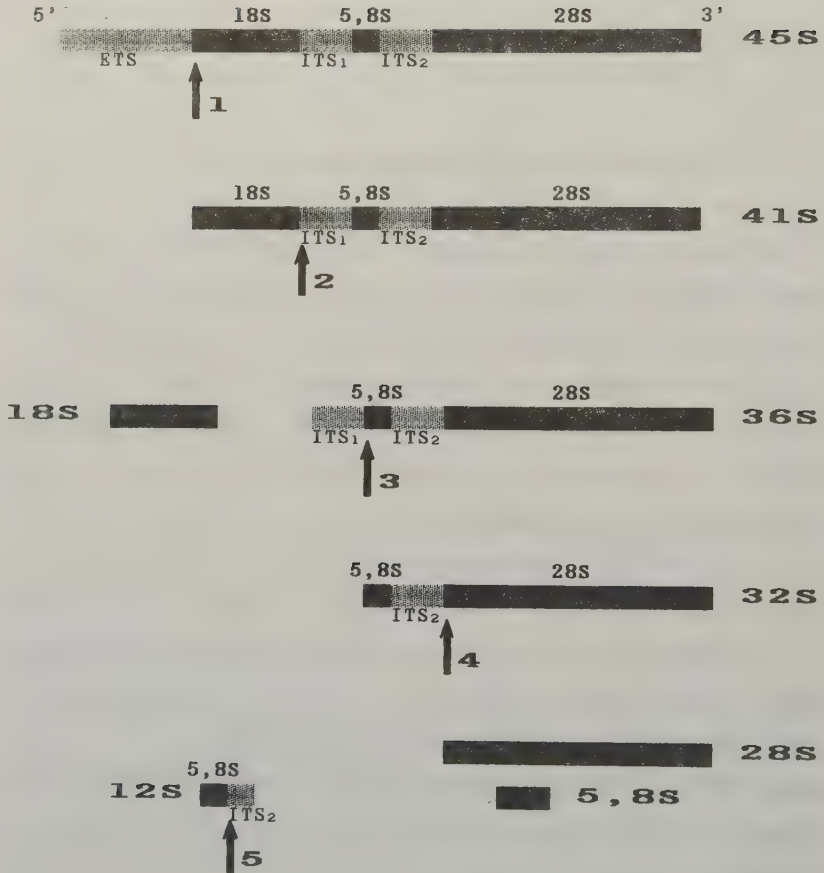


Fig. 1: "Mäuse-L Zell Weg" des Prozessierens ribosomaler RNA.

Zusammengestellt aus Perry (1976); Hadjiolov & Nikolaev (1976); Winicov (1976); Hadjiolov (1985, S. 93). 5,8S RNA ist über Wasserstoffbrücken an 28S RNA gebunden. 12S RNA nach Bowman *et al.* (1981) und Dudov *et al.* (1983).

Für menschliche HeLa Zellen wurde erstmals ein zweiter "klassischer" Prozessierungsweg beschrieben (Weinberg *et al.*, 1967; Weinberg & Penman, 1970; Maden *et al.*, 1972; Wellauer & David, 1973), der sich vom obigen Schema nur durch die zeitlich geänderte Abfolge von Schnitt Nr. 2 und 3 unterscheidet (Fig. 2). Aus 41S RNA entstehen in diesem Zelltyp durch Schnitt an Position Nr. 3 erst 20S RNA (21S RNA ⁴⁾) und 32S RNA. Während aus 32S RNA - wie oben geschildert - 5,8S- und 28S RNA gebildet werden, stellt 20S (21S) RNA das Vorläufermolekül von 18S RNA dar. 18S RNA entsteht schließlich durch Abtrennen des internen transkribierten spacers ITS₁ an der Schnittstelle Nr. 2 (Fig. 2).

Es ist wichtig zu erwähnen, daß das 45S Primärtranskript bereits während der Transkription mit Proteinen bedeckt wird. Das Prozessieren ribosomaler RNA findet also nicht an freier RNA, sondern an RNA-Proteinkomplexen - den Preribosomen - statt (Warner & Soeiro, 1967; Koshiba *et al.*, 1971; Maden, 1971; Shepherd & Maden, 1972; Kumar & Warner, 1972; Bachellerie *et al.*, 1975; Hadjiolov & Nikolaev, 1976; Maden *et al.*, 1977; Wool, 1979, S. 747; Hadjiolov, 1985, S. 103-109; Sommerville, 1985).

Diese beiden "klassischen" Schemata stellen den Ablauf des Prozessierens jedoch lediglich so vereinfacht dar, wie es zur Diskussion der vorliegenden Arbeit notwendig ist.

So können in manchen Zelltypen Schnitt Nr. 2 und 3 auch gleichzeitig erfolgen oder beide Prozessierungswege parallel

auftreten (Purtell & Antony, 1975; Winicov, 1976; Dabeva *et al.*, 1976; Dudov *et al.*, 1978; Bowman *et al.*, 1981).

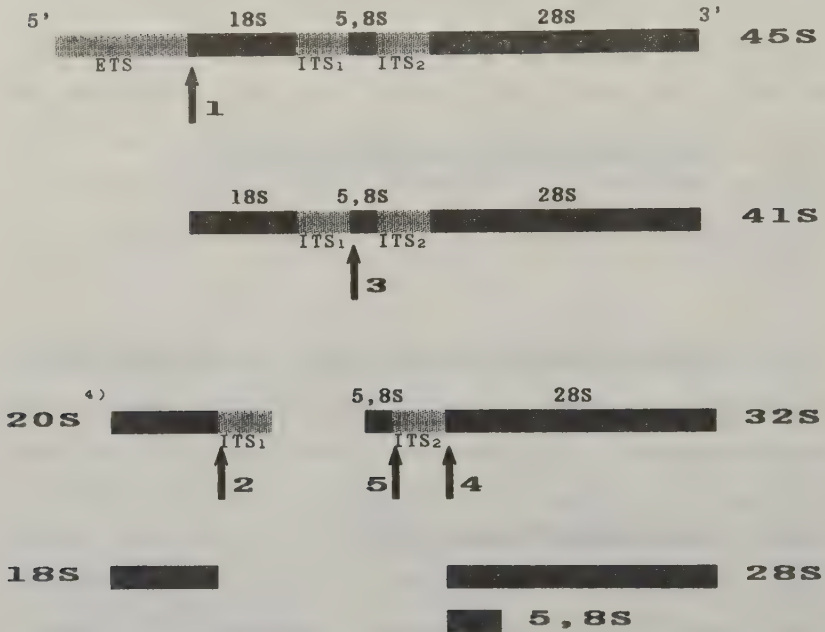


Fig. 2 : "HeLa Zell Weg" des Prozessierens ribosomaler RNA.

Schnitt Nr. 3 erfolgt vor Schnitt Nr. 2. Zusammengestellt aus Perry (1976); Hadjiolov & Nikolaev (1976); Winicov (1976); Hadjiolov (1985, S. 93). 12S Zwischenprodukt nach Schnitt Nr. 4 (siehe Fig. 1) nicht eingezeichnet.

4) von Hadjiolov durchweg als "21S RNA" bezeichnet

Schließlich wurden weitere alternative Prozessierungswege (Dudov *et al.*, 1978; Bowman *et al.*, 1981; Dudov & Dabeva, 1983), ein 8S RNA Vorläufermolekül von 5,8S RNA in Novikoff Hepatomazellen (Reddy *et al.*, 1983) und weitere Prozessierungsstellen gefunden bzw. deren genaue Position bestimmt (Kominami *et al.*, 1978; Miller & Sollner-Webb, 1981; Bachellerie *et al.*, 1983; Bowman *et al.*, 1983; Fetherston *et al.*, 1984; Hadjiolova *et al.*, 1984a; Hadjiolova *et al.*, 1984b).

Jeder dieser Schritte könnte damit - direkt oder indirekt - der Angriffspunkt von Ovalicin sein.

Problemstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Überprüfung der Hypothese von Zimmermann & Hartmann (1981), daß Ovalicin das Prozessieren ribosomaler RNA beeinflusst. Dazu wurde die Wirkung von Ovalicin auf den Stoffwechsel ribosomaler RNA in einer Lymphomzelllinie der Maus (S49.1) untersucht.

MATERIAL & METHODEN

Geräte

Szintillationszähler: Searle (Frankfurt), Isocap 300
Searle (Frankfurt), Modell 6892
Zählausbeute für [^3H] jeweils ca. 60%

CO_2 -Brutschrank: Forma Scientific (Labotect, Göttingen),
Modell 3157

Falcon-Zellkulturflaschen:
50 ml (25 cm^2): Greiner (Nürtingen) Art. Nr. 690 160
260 ml (80 cm^2): Nunc (Wiesbaden) Kat. Nr. 153732

Gelschneidegerät: Bio-Rad (München), Modell 190

Densitometer: Joyce Loebel (Düsseldorf), Microdensitometer 3CS

Röntgenfilme: KODAK X-Omat AR XAR-5
FUJI RX

Enzyme

Desoxyribonuklease I (DNase I) aus Rinderpankreas
Reinheitsgrad I Boehringer Mannheim, Best. Nr. 104 132
Lot. Nr. 1313132/Sept.1985

DNase I, deren RNase Aktivität mit Jodacetamid nach
(Zimmermann & Sandeen, 1966) deaktiviert wurde, stellte
freundlicherweise M. Lipp zur Verfügung.

Proteinase K aus *Tritirachium album* Boehringer Mannheim,
Best. Nr. 161 519

Proteinase K aus Pilzen Merck (Darmstadt), Art. Nr. 24568

Ribonukleinsäuren

23S- und 16S rRNA aus *E. coli* MRE 600 Boehringer Mannheim,
Best. Nr. 206 938

5S rRNA aus *E. coli* MRE 600 Boehringer Mannheim,
Best. Nr. 206 911

| tRNA aus *E. coli* MRE 600 | Boehringer Mannheim, Best. Nr. 109 541 |
| tRNA aus Bierhefe | Boehringer Mannheim, Best. Nr. 109 517 |

URNAS 1-6 (ohne U3 RNA) aus Ehrlich Ascites Tumorzellen wurden freundlicherweise von R. Lührmann (Berlin) zur Verfügung gestellt

Chemikalien

Agarose Typ 1 Sigma (Deisenhofen), Nr. A-6013

Agarose 5'-(p-aminophenylphosphoryl)-uridin-2'(3')-phosphat
Miles Laboratories (Frankfurt), Code Nr. 34.203. Lot. Nr. 63

Vanadyl(IV)sulfat $\text{VOSO}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ Aldrich (Steinheim),
Kat. Nr. 23.370-6

L-[methyl-³H]Methionin 78-89 Ci·mmol⁻¹ Amersham Buchler
(Braunschweig), TRK. 583 (1,0 mCi·ml⁻¹)
TRK. 705 (5,0 mCi·ml⁻¹)

[5-³H]Uridin 27-30 Ci·mmol⁻¹ Amersham Buchler (Braunschweig),
TRK. 178 (1.0 mCi·ml⁻¹)

Ovalicin wurde überlassen von H. P. Sigg, Sandoz, Basel

Amplify Amersham Buchler (Braunschweig)

Soluene 350 Packard (Frankfurt)

Nonidet P-40 (NP 40) Sigma (Deisenhofen), Nr. N-6507,
Lot. Nr. 121E-7709

Harnstoff Merck (Darmstadt), Art. Nr. 8487

Formaldehydlösung min. 37% (stabilisiert mit etwa 10% Methanol) Merck (Darmstadt), Art. Nr. 3997

3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS) Sigma (Deisenhofen),
Nr. M-1254

Medien und Seren für die Zellkultur

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)

Dulbecco's Modified Eagle Medium in Pulverform
mit Glucose und L-Glutamin
Gibco Europe (Karlsruhe), Kat. Nr. 074-2100

3,7 g NaHCO_3
300 mg Penicillin "G"
100 mg Streptomycinsulfat
110 mg Natriumpyruvat
3,5 ml 3N HCl

ddH₂O -> 1 l
membransterilisiert
in 5% CO₂ -> pH 7,4

Methioninfreies DMEM

100 ml 10X Salzlösung:	64,0 g NaCl
	4,0 g KCl
	2,0 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$
	2,65 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$
	45 g Glucose
	150 mg Phenolrot
	1,25 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
	ddH ₂ O -> 1 l
10 ml 100X Aminosäuren 1:	0,84 g L-Arginin·HCl
	0,42 g L-Histidin·HCl·H ₂ O
	1,05 g L-Isoleucin
	0,66 g L-Phenylalanin
	0,95 g L-Threonin
	0,16 g L-Tryptophan
	0,94 g L-Valin
	5,84 g L-Glutamin
	0,1N HCl -> 100 ml
20 ml 50X Aminosäuren 2:	0,48 g L-Cystein
	0,72 g L-Tyrosin
	0,1N HCl -> 200 ml
10 ml 100X Aminosäuren 3:	0,30 g Glycin
	0,42 g L-Serin
	0,1N HCl -> 100 ml
10 ml 100X Leucin:	1,05 g L-Leucin
	ddH ₂ O -> 100 ml
10 ml 100X Lysin:	1,46 g L-Lysin·HCl
	ddH ₂ O -> 100 ml
10 ml 100X Natriumpyruvat:	1,1 g Natriumpyruvat
	ddH ₂ O -> 100 ml

1 ml 1000X Eisennitrat:	10 mg $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$ ddH ₂ O -> 100 ml
1 ml 1000X Adenosin:	535 mg Adenosin ddH ₂ O -> 100 ml
2 ml 500X Guanosin:	567 mg Guanosin ddH ₂ O -> 200 ml
10 ml 100X Natriumformiat:	13,6 g Natriumformiat ddH ₂ O -> 100 ml
10 ml 100X Vitamine:	Flow (Meckenheim), Best. Nr. 16-014-49

3,7 g NaHCO_3
 300 mg Penicillin "G"
 100 mg Streptomycinsulfat
 110 mg Natriumpyruvat
 1,2 ml 3N HCl

ddH₂O -> 1 l
 membransterilisiert
 in 5% CO₂ -> pH 7,4

2X Methioninfreies DMEM

entspricht methioninfreiem DMEM
 ddH₂O -> 500 ml

Pferdeserum Seromed (München), Kat. Nr. S 0135, Ch. B. 20320

Pferdeserum, dialysiert Gibco Europe (Karlsruhe),
 Kat. Nr. 063-6350

Hank's Balanced Salt Solution (BSS)

(vergl.: Weiner, 1976; Paul, 1980, S. 93-96)

BSS I: 10,0 g Glucose
 0,6 g KH_2PO_4
 4,2 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$
 0,1 g Phenolrot
 ddH₂O -> 1 l

BSS II: 1,9 g CaCl_2
 4,0 g KCl
 80,0 g NaCl
 2,0 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$
 2,0 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$
 ddH₂O -> 1 l

vor Gebrauch 10 ml BSS I + 10 ml BSS II + 80 ml ddH₂O
 membransterilisiert

2X BSS

entsprechend BSS im halben Volumen

Lösungen

Lysierpuffer

10 mM TRIS-HCl pH 7,5
 1 mM EDTA pH 7
 150 mM NaCl
 0,6% NP 40

Proteinase K / SDS

10 mM TRIS-HCl pH 7,5
 10 mM Vanadylribonukleosidkomplex (S. 22)
 0,5% SDS
 500 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ Proteinase K

TEN Puffer

100 mM TRIS-HCl pH 7,5
 10 mM EDTA pH 7
 150 mM NaCl

DNase Puffer

50 mM TRIS-HCl pH 7,5
 100 mM NaCl
 10 mM MgCl_2
 autoklaviert

Harnstoffpuffer

10 mM TRIS·HCl pH 7,5
 1 mM EDTA pH 7
 7M Harnstoff
 350 mM NaCl
 1% SDS

TE Sarkosyl

10 mM TRIS·HCl pH 7,5
 10 mM EDTA pH 7
 1% Sarkosyl

10X TRIS·EDTA·Borat pH 8,3

104 g TRIS
 55 g Borsäure
 40 ml 0,05M EDTA pH 8,0
 ddH₂O -> 1 l
 autoklaviert

Phenol

mit TEN Puffer gesättigt, wie bei Maniatis *et al.* (1982, S. 438) beschrieben

Zellkultur

S49.1 Lymphomzellen, ursprünglich von Horibata & Harris (1970) aus einer weiblichen BALB/c/St-Maus isoliert, wurden freundlicherweise von U. Gehring (Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Sie wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) unter Zugabe von 10% Pferdeserum in Falcon-Zellkulturflaschen mit lose aufgeschraubtem Verschuß bei 37°C in einem CO₂-Brutschrank gehalten. Der optimale pH Wert des Mediums von 7,4 stellte sich in einer CO₂-Atmosphäre von 5 - 6% ein. Die Kulturen wurden spätestens bei einer Zelldichte von $2 \cdot 10^6$ Zellen $\cdot \text{ml}^{-1}$ mit frischem Medium (37°C, pH 7,4) 1:20 bis 1:40 verdünnt. Unter optimalen Bedingungen teilten sich die Zellen - in kleinen 50 ml Zellkulturflaschen - alle 12 - 14 h.

Zur Bestimmung ihrer Zelldichte wurden den Kulturen kleine Aliquots (ca. 0,2 ml) entnommen und mit dem gleichen Volumen Trypanblaulösung (0,3% in 0,85% NaCl) gemischt. In einer Neubauer-Zählkammer (0,1 mm tief, 0,0025 mm²) wurden unter einem Phasenkontrastmikroskop bei 125facher Vergrößerung je sechzehn 1 mm²-Felder ausgezählt. Lebende Zellen blieben farblos, tote Zellen wurden blau gefärbt (Vitalfärbung).

Zum Einfrieren der Zellen wurden ca. $2 \cdot 10^7$ Zellen 5 min in einer Heraeus Christ Zentrifuge bei 2 500 Upm und 4°C abzentrifugiert und in 1 ml eiskaltem Pferdeserum, das 10% DMSO enthielt, aufgenommen. Sie wurden in einem fest verschlossenen Ampullenröhrchen kurz in Eis belassen, dann in einem Styroporbehälter über Nacht bei -70°C gestellt und schließlich in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Kurzfristig (ca. zwei Monate)

konnten die Zellen auch bei -70°C aufgehoben werden.

RNasefreie DNase

DNase I (Reinheitsgrad I, Boehringer Mannheim) wurde nach der Methode von Maxwell *et al.* (1977) von RNasen gereinigt. Diese Vorschrift ist auch bei Maniatis *et al.* (1982, S. 451) beschrieben. Das Verfahren beruht auf einer Affinitätschromatographie an einem agarosegekuppelten Uridinderivat.

DNase I, deren RNase Aktivität nach Zimmerman & Sandeen (1966) mit Jodacetamid zum großen Teil inaktiviert wurde, stellte M. Lipp zur Verfügung.

RNase Aktivität der DNase

Wurden je 50 μg 23S- und 16S rRNA aus *E. coli* mit je 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ nach Maxwell *et al.* (1977) gereinigter DNase in je 500 μl DNase Puffer bei 37°C inkubiert und die Reaktion nach verschiedenen Zeiten (0 min, 10 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h und 24 h) durch Zugabe von EDTA und Sarkosyl (siehe S. 30) gestoppt, ethanolgefällt und in einem 0,8% Agarose - 2,2M Formaldehydgel (S. 32) aufgetrennt, war ein beginnender Abbau von RNA nach 4 h Inkubationszeit zu beobachten. Nach 8 h Inkubationsdauer war noch unabgebaute RNA sichtbar. Eine Verunreinigung des DNase Puffers mit RNasen als Ursache dieses

Abbaus konnte im Parallelversuch durch eine 24 h Inkubation der RNAs bei 37°C ausgeschlossen werden. Es handelt sich demnach wahrscheinlich um eine Restaktivität des gereinigten Enzyms, die auch Maxwell *et. al.* (1977) beschrieben.

Aufgrund dieses Ergebnisses konnte die auf diese Weise gereinigte DNase in dieser Konzentration ($100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) für einen 1 h Abbau von DNA während der Isolierung von KernRNA (S. 28-30) verwendet werden.

Ein Kontrollexperiment mit ungereinigter DNase I (Reinheitsgrad I, Boehringer Mannheim) zeigte jedoch, daß dieses Enzym bereits "von Haus aus" wenig mit RNasen kontaminiert war. So begann - unter den oben beschriebenen Bedingungen - ein Abbau von 23S- und 16S rRNA auch erst nach 2 h Inkubationszeit. Der Abbau war jedoch nach 4 h im Vergleich zum gereinigten Enzym weiter fortgeschritten.

Es gelang nicht, durch das Verfahren von Maxwell *et al.* (1977) die höhere RNase Kontamination der DNase I des Reinheitsgrades II (Boehringer Mannheim) zu eliminieren.

Analoge Experimente wurden mit DNase I durchgeführt, die von M. Lipp mit Jodacetamid behandelt wurde.

$10 \mu\text{g}$ 23S- und 16S rRNA aus *E. coli* wurden nach 1 h Inkubation mit $200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ dieser DNase noch nicht erkennbar abgebaut. Nach 2 h Inkubationsdauer war ein beginnender Abbau erkennbar. Aufgrund dieses Ergebnisses wurde das Enzym in einer geringeren Konzentration von $30 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ zur Eliminierung von DNA

während der RNA Isolierung (S. 28-30) eingesetzt.

DNase Aktivität

In einem Experiment wurde die DNase Aktivität des jodacetamid-behandelten Enzyms getestet.

5 OD T7 DNA [250 µg] ¹⁾ wurden mit 5 µg·ml⁻¹ dieses Enzyms bei 37°C inkubiert. Nach verschiedenen Zeiten wurde 1/10 des Ansatzes entnommen, die Reaktion - wie oben beschrieben - gestoppt, ethanolpräzipitiert und auf einem Agarosegel analysiert. Bereits nach 2 min Inkubationsdauer wurde die T7 DNA vollständig abgebaut.

Ein entsprechender Versuch wurde mit nach Maxwell *et. al.* (1977) gereinigter DNase nicht durchgeführt, da keine wesentliche Abnahme der Enzymaktivität zu erwarten war.

Vanadylribonukleosidkomplex

Zur Inhibierung von RNase Aktivitäten wurden während der Isolierung von RNA die vier Vanadylribonukleosidkomplexe eingesetzt (Berger & Birkenmeier, 1979; Puskas *et al.* 1982). Die Komplexe wurden selbst hergestellt und jeweils in einer Endkonzentration von 10 mM zugesetzt. Die Vorschrift zur Herstellung der Komplexe ist auch bei Maniatis *et al.* (1982, S.

¹⁾ dies entspricht ungefähr der Menge an DNA, die nach Gurney (1984) für $2,3 \cdot 10^7$ Zellen (vgl. S. 28) zu erwarten war (10 pg DNA pro Zelle)

188-189) zu finden. Da alle vier Komplexe zusammen hergestellt und eingesetzt werden, werden sie im folgenden als der "Komplex" bezeichnet.

Die unansehnlich olivgrüne Farbe des Komplexes änderte sich während der RNA Isolierung und reichte von schmutziggrünen und bräunlichen Tönen bis zu recht ansprechenden Farben wie dezent rosa und ästhetisch cremefarben. Ethanolgefällte DNA aus vanadylribonukleosidkomplexhaltigen Lösungen war gelb gefärbt, wenn sie in Gegenwart von Natriumacetat pH 5,2 (nach Maniatis *et al.*, 1982, S. 461) ausgefällt wurde. Sie blieb in Gegenwart von Natriumacetat pH 7 zwar farblos, war aber dennoch mit dem Vanadylkomplex assoziiert (erkennbar durch Phenolbehandlung und UV Absorption, s.u.)

Die Enzymreaktionen während der RNA Isolierung wurden nicht gestört, DNase I baute sowohl gelbe als auch farblose DNA ab, eine Hemmung von Proteinase K konnte nicht festgestellt werden.

Äquimolare Mengen EDTA zerstörten bei 37°C den Komplex (Farbumschlag nach hellblau).

Der Vanadylribonukleosidkomplex störte die optische Bestimmung von RNA. Die optische Dichte bei 260 nm erhöhte sich bis zum vierfachen der tatsächlichen Absorption, das Maximum der Absorption verschob sich dabei von 258 nm auf 254 nm. Das Maximum der Absorption des reinen Komplexes lag jedoch - wie bei RNA - zwischen 258 nm und 259 nm.

Der Komplex konnte durch Ausschütteln mit puffergesättigtem Phenol, das 0,1% 8-Hydroxychinolin enthielt, entfernt werden (Maniatis *et al.*, 1982, S. 188). Vanadylribonukleosidkomplex-

haltige Lösungen wurden daher zur optischen Bestimmung ihres RNA Gehalts solange mit Phenol (ohne Chloroform) behandelt, bis die - durch den Komplex schwarz bis olivgrün gefärbten - phenolischen Phasen ihre gelbe Farbe behielten, dreimal mit dem gleichen Volumen Chloroform / Isoamylalkohol (24+1) extrahiert und ethanolgefällt (S. 29).

RNA Bestimmung

Getrocknete ethanolgefällte RNA Proben wurden in 0,6 - 1 ml 10mM Triethanolaminhydrochlorid pH 7,4 aufgenommen (Chirgwin *et al.*, 1979) und die optische Dichte bei 260 nm gemessen. Mengenangaben in "µg" oder "pg" beziehen sich auf die Annahme, daß 50 µg·ml⁻¹ RNA bei 260 nm eine optische Dichte von 1 ergeben (Chirgwin *et al.*, 1979; Walter & Blobel, 1982). Da diesbezügliche Angaben für RNA in der Literatur schwanken ²⁾ bzw. meistens fehlen, wurden alle Mengenangaben in "µg" oder "pg", die aus Messung der optischen Dichte resultierten, in eckige Klammern gesetzt.

²⁾ 1 OD $\approx$ 31,3 µg·ml⁻¹ nach Cooper & Braverman (1977)
 1 OD $\approx$ 40 µg·ml⁻¹ nach Emerson (1971)
 und Maniatis *et al.* (1982, S. 468)
 1 OD $\approx$ 41,7 µg·ml⁻¹ nach Peacock & Dingman (1967)

Bestimmung der Radioaktivität

Radioaktive wässrige Proben wurden - wenn nicht anders angegeben (vgl. S. 35-36) - in Zählgläschen auf kreisrunde Whatman GF/C Glasfiberfilter (Durchmesser 2,5 cm) aufgetrocknet und in 10 ml Szintillationsflüssigkeit, bestehend aus Toluol, $4 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ 2,5-Diphenyloxazol (PPO) und $50 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 1,4-Di-2-(5-phenyloxazolyl)benzol (POPOP) in einem Szintillationszähler 1 - 2 min je Probe gezählt. Alle Werte wurden um einen Zählhintergrund von 30 cpm korrigiert.

Inkubation mit Ovalicin

Ovalicin, $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}_5$ (MW 296) wurde in BSS (S. 16) in einer Konzentration von $2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ gelöst, nach Verdünnung mit BSS als $4 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ Stammlösung bei -20°C aufbewahrt und vor Gebrauch auf 37°C erwärmt. 12 - 20 ml einer Kultur von S49.1 Zellen wurden bei einer Zelldichte von $7 \cdot 10^5 \text{ Zellen} \cdot \text{ml}^{-1}$ mit Ovalicin der Endkonzentration $2 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ versetzt. Dabei wurden Kulturen einer Zelldichte von ca. $1,5 \cdot 10^6 \text{ Zellen} \cdot \text{ml}^{-1}$ mit frischem Medium, das bereits die entsprechende Menge der $4 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ Ovalicinstammlösung enthielt, so verdünnt, daß die gewünschte Zelldichte resultierte. Die Kulturen der Kontrollzellen enthielten statt der Droge die entsprechende Menge BSS.

Markierung mit [^3H]Methionin

Je 2,5 ml L-[methyl- ^3H]Methionin (2,5 mCi, 78-89 Ci·mmol $^{-1}$) wurden mit jeweils 2,5 ml zweifach konzentriertem methionin-freiem DMEM gemischt und über Nacht oder mindestens 3 h im CO $_2$ -Brutschrank bei 37°C inkubiert. Mit ca. 10 μl 3N HCl wurde darauf ein pH von ca. 7,4 eingestellt (Indikatorfarbe).

Je $2,5 \cdot 10^7$ Zellen wurden durch Zentrifugation in einer Haereus Christ Zentrifuge in 5 min bei 900 Upm und 4°C gesammelt und in je 6,6 ml methioninfreiem DMEM aufgenommen, das 20% dialysiertes Pferdeserum und entweder 0,6 ml $4 \cdot 10^{-6}\text{M}$ Ovalicin oder 0,6 ml BSS (Kontrolle) enthielt. Diese Zellsuspension wurde anschließend den vorbereiteten [^3H]Methionin enthaltenden Medien zugegeben und 20 - 90 min im CO $_2$ -Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Das Markierungsmedium bestand somit aus je

11 ml methioninfreiem DMEM

0,6 ml $4 \cdot 10^{-6}\text{M}$ Ovalicin bzw. 0,6 ml BSS

10% dialysiertem Pferdeserum

2,5 mCi [methyl- ^3H]Methionin.

Die Zelldichte betrug $1,8 - 2 \cdot 10^6$ Zellen·ml $^{-1}$.

Methioninfreies DMEM enthielt bereits 20 mM Natriumformiat, $2 \cdot 10^{-5}\text{M}$ Adenosin und $2 \cdot 10^{-5}\text{M}$ Guanosin (S. 16), um die Purin - *de novo* - Biosynthese und damit den Eintritt der markierten Methylgruppe in den C-1 Stoffwechsel der Zelle zu inhibieren

(Weinberg & Penman, 1968; Maden & Salim, 1974; Wolf & Schlesinger, 1977; Chen-Kiang *et al.*, 1979). Die spezifische Radioaktivität der isolierten GesamtkernRNA betrug nach 20 min Inkubation mit [methyl- ^3H]Methionin in unbehandelten Kontrollzellen $3,8 \cdot 10^4 \text{ cpm} \cdot \text{OD}^{-1}$ [$770 \text{ cpm} \cdot \mu\text{g}^{-1}$], nach 30 min $1,8 \cdot 10^5 \text{ cpm} \cdot \text{OD}^{-1}$ [$3,6 \cdot 10^3 \text{ cpm} \cdot \mu\text{g}^{-1}$], nach 40 min $4,1 \cdot 10^5 \text{ cpm} \cdot \text{OD}^{-1}$ [$8,2 \cdot 10^3 \text{ cpm} \cdot \mu\text{g}^{-1}$], nach 60 min $7,6 \cdot 10^5 \text{ cpm} \cdot \text{OD}^{-1}$ [$1,5 \cdot 10^4 \text{ cpm} \cdot \mu\text{g}^{-1}$] und nach 90 min $6,2 \cdot 10^5 \text{ cpm} \cdot \text{OD}^{-1}$ [$1,2 \cdot 10^4 \text{ cpm} \cdot \mu\text{g}^{-1}$] (siehe auch Tab. 6, S. 54).

Markierung mit [^3H]Uridin

500 μl [$5\text{-}^3\text{H}$]Uridin (500 μCi , 27-30 $\text{Ci} \cdot \text{mmol}^{-1}$) wurden mit 500 μl zweifach konzentriertem BSS (S. 17) gemischt, zu gleichen Teilen einer ovalicinbehandelten Kultur und einer unbehandelten Kontrollkultur bei einer Zelldichte von $1,1 - 1,4 \cdot 10^6 \text{ Zellen} \cdot \text{ml}^{-1}$ (entsprechend $1,3 - 1,6 \cdot 10^7 \text{ Zellen}$ in 11,6 ml Kulturmedium) zugesetzt und 30 - 90 min im CO_2 -Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die spezifische Radioaktivität von Gesamtkern-RNA betrug nach 30 min Inkubation mit [^3H]Uridin $1,6 - 2,2 \cdot 10^6 \text{ cpm} \cdot \text{OD}^{-1}$ [$3,2 - 4,4 \cdot 10^4 \text{ cpm} \cdot \mu\text{g}^{-1}$], nach 60 min $3,5 - 3,8 \cdot 10^6 \text{ cpm} \cdot \text{OD}^{-1}$ [$7,0 - 7,6 \cdot 10^4 \text{ cpm} \cdot \mu\text{g}^{-1}$] und nach 90 min $4,2 \cdot 10^6 \text{ cpm} \cdot \text{OD}^{-1}$ [$8,4 \cdot 10^4 \text{ cpm} \cdot \mu\text{g}^{-1}$] (siehe auch Tab. 4, S. 51).

Isolierung der Kern RNA

Die hier beschriebene Methode zur Isolierung von RNA aus Zellkernen und Cytoplasma hat im wesentlichen Lipp (1981) ausgearbeitet. Sie wurde jedoch etwas modifiziert. Dies betrifft vor allem den Einsatz eines RNase Inhibitors (S. 22) und den Aufschluß der Zellkerne mit Proteinase K und SDS.

Je $1,3 - 2,3 \cdot 10^7$ Zellen (in ca. 12 ml) wurden nach der radioaktiven Markierung mit je 600 μ l 200 mM Vanadylribonukleosidkomplex versetzt (Endkonzentration 10 mM), in 50 ml Röhrchen überführt und durch Zentrifugation in einer Heraeus Christ Zentrifuge 10 min bei 2 500 Upm (980 g) und Raumtemperatur sedimentiert. Das überstehende Medium wurde abdekantiert, die Zellen bei 0°C kurz im verbliebenen Rest des Mediums suspendiert und anschließend mit je 2 ml eiskaltem Lysierpuffer - der 10 mM Vanadylribonukleosidkomplex und das nichtionische Detergens NP 40 (Borun *et al.*, 1967) enthielt - versetzt. Die Lyse der Zellen fand sofort nach Zugabe des Lysierpuffers statt, was unter einem Phasenkontrastmikroskop überprüft wurde (die Zellkerne erscheinen schwarz; vgl. Penman, 1966). Die Ansätze wurden kurz "gevortext", kurz mit einer Pasteurpipette suspendiert und sofort in eisgekühlte 10 ml Spitzröhrchen überführt. Die Zellkerne wurden in einer Heraeus Christ Zentrifuge bei 2 500 Upm (980 g) und 4°C in 5 min sedimentiert. Die Überstände wurden abgezogen und zur Isolierung cytoplasmatischer RNA (S. 31) weiterverarbeitet.

Die gesammelten Kerne wurden in je 2 ml Proteinase K / SDS aufgenommen, vorsichtig mit einer Pasteurpipette suspendiert und 1 h bei 37°C inkubiert, bis eine klare, durch den Vanadyl-ribonukleosidkomplex schwarzgrün gefärbte Lösung entstand. Sie wurde mit je 1 ml Phenol (mit TEN Puffer gesättigt, mit 0,1% 8-Hydroxychinolin) und je 1 ml Chloroform / Isoamylalkohol (24+1) versetzt, in geschlossenen 10 ml Röhrchen je 1 h lang maschinell gewendet und zur Trennung der Phasen 10 min in einem SS34 Rotor einer SORVALL Zentrifuge bei 10 000 Upm und 15°C zentrifugiert. Die wässrigen Phasen wurden vorsichtig abgezogen und noch einmal in der gleichen Weise phenolisiert ³⁾. Beide - durch den Vanadylribonukleosidkomplex schwarz gefärbten - Phenolphasen wurden vereinigt und mit je 3 ml 10 mM TRIS · HCl pH 7,4 30 min ausgeschüttelt und wie oben zentrifugiert. Die vereinigten wässrigen Phasen (je ca. 5 ml) wurden insgesamt dreimal mit dem gleichen Volumen Chloroform / Isoamylalkohol (24+1) je 15 min ausgeschüttelt und zur Phasentrennung jeweils 5 min in einer Heraeus Christ Zentrifuge bei 2 500 Upm und Raumtemperatur zentrifugiert. Die wässrigen Phasen wurden jeweils halbiert, mit je $\frac{1}{10}$ ihres Volumens an 3M Natriumacetat pH 7 und je 2,5 Volumenteilen absoluten, -20°C kalten Ethanols versetzt und über Nacht bei -20°C stengelassen. Die ausgefällten Nukleinsäuren wurden durch Zentrifugation in einem SS34 Rotor bei 10 000 Upm und 15°C 20 min in einer SORVALL Zentrifuge sedimentiert, 5 min im Vakuum getrocknet und

³⁾ Nach Markierung der Zellen mit [methyl-³H]Methionin (Experimente mit der Versuchsbezeichnung "M", siehe Tab. 2, S. 48) wurden die aufgeschlossenen Zellkerne statt zweimal 1 h jedoch nur zweimal $\frac{1}{2}$ h phenolisiert. Dies hatte eine geringere Ausbeute an RNA zur Folge (siehe Tab. 2, S. 48 und Diskussion S. 126-127)

10 min in je 0,3 ml DNase Puffer bei 0°C vorsichtig auf einem Schüttler (150 Upm) gelöst. Bei Versuchen mit 20 - 60 min [^3H]Methioninmarkierung wurden je $100\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ der DNase I eingesetzt, die nach Maxwell *et al.* (1977) von RNasen gereinigt wurde, bei Versuchen mit [^3H]Uridinmarkierung und 90 min [methyl- ^3H]Methioninmarkierung wurden je $30\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ der RNase-freien DNase eingesetzt, die M. Lipp zur Verfügung stellte. In beiden Fällen wurde 1 h bei 37°C inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von je 10 μl 0,5M EDTA pH 8, 10 μl 20% Sarkosyl und 5 μl Proteinase K ($20\ \text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) gestoppt, 30 min weiter inkubiert und die Ansätze danach wiederum halbiert.

Somit standen jeweils 4 Aliquots pro aufgearbeiteter Zellkultur zur Verfügung. Drei Aliquots wurden - wie oben beschrieben - 3 h bei -70°C mit Ethanol gefällt und anschließend durch Gelelektrophorese analysiert. Das vierte Aliquot wurde - zur restlosen Entfernung des Vanadylribonukleosidkomplexes (vgl. S. 23-24) - so lange mit dem jeweils gleichen Volumen Phenol (mit 8-Hydroxychinolin) ohne Chloroform je 10 min extrahiert, bis die ursprünglich schwarz bis olivgrün gefärbte phenolische Phase gelb blieb. Nach Reextraktion der vereinigten Phenolphasen mit 10 mM TRIS-HCl pH 7,4 wurden die wässrigen Phasen je dreimal mit dem gleichen Volumen Chloroform / Isoamylalkohol (24+1) ausgeschüttelt, mit Ethanol gefällt (S. 29) und zur optischen Bestimmung der isolierten RNA und deren Radioaktivität verwendet.

Aus unbehandelten Kontrollzellen wurden mit dieser Methode 0,11 - 0,55 OD / 10^6 Zellen [$5,6 - 21,2\ \text{pg}\cdot\text{Zelle}^{-1}$] isoliert (siehe auch Tab. 2, S. 48 und Diskussion S. 126-127).

Isolierung cytoplasmatischer RNA

Der nach Sedimentation der Zellkerne erhaltene Überstand (S. 28) wurde in einem SS34 Rotor einer SORVALL Zentrifuge 20 min bei 10 000 Upm und 4°C zentrifugiert, vorsichtig abgezogen, in 10 ml Röhrchen mit jeweils dem gleichen Volumen Harnstoffpuffer (der 10 mM an Vanadylribonukleosidkomplex war) versetzt und ca. 30 min unter gelegentlichem Umschwenken bei Raumtemperatur stehengelassen. Anschließend wurden die Lösungen - wie unter "Isolierung von Kern RNA" beschrieben - phenolisiert (S. 29), ebenso halbiert und über Nacht bei -20°C - wie oben beschrieben - ethanolgefällt (S. 29).

Cytoplasmatische RNA wurde, wie bei "den Kernen" beschrieben, durch Zentrifugation gesammelt, im Vakuum getrocknet und in je 700 µl TE Sarkosyl aufgenommen. Die Lösungen wurden je 30 min mit 100 µg·ml⁻¹ Proteinase K bei 37°C inkubiert und anschließend halbiert, um wiederum 4 Aliquots pro aufgearbeiteter Zellkultur zu erhalten, die - wie unter "Kerne" beschrieben (S. 30) - weiterverarbeitet wurden.

Aus unbehandelten Kontrollzellen wurden dabei 0,03 - 0,14 OD / 10⁶ Zellen [1,4 - 6,9 pg·Zelle⁻¹] isoliert.

Ethanolfällungen cytoplasmatischer RNA fielen - vermutlich aufgrund des geringeren Gehaltes in einem größeren Volumen - nicht quantitativ aus. Eine zuverlässige Bestimmung des RNA - Gehalts war daher nicht möglich.

Gelelektrophorese

Agarose - Formaldehydgele

Agarose - Formaldehydgele (Gurney, 1984; Lehrach *et al.*, 1977) wurden wie bei Maniatis *et al.* (1982, S. 158) beschrieben, auf Glasplatten (16,4 cm · 13,4 cm) gegossen und in Flachbettgelapparaturen horizontal gefahren (Elektrophoresepuffer MOPS · EDTA · Acetat nach Maniatis *et al.*, 1982, S. 202). Die benötigte Menge Agarose (880 mg für 0,8%ige, 1,75 g für 1,6%ige Gele) wurde 4 min in einem Mikrowellenherd mit 68,5 ml ddH₂O erhitzt, der Wasserverlust durch miterhitztes ddH₂O ersetzt und unter Rühren im Abzug 22 ml 5X MOPS · EDTA · Acetat pH 7 (Maniatis *et al.*, 1982, S. 202) und 19,6 ml 35% Formaldehydlösung (Endkonzentration 2,2M) zugegeben. Die erhaltenen Gele waren 5 mm dick.

Sollten die RNA Banden unter ultraviolettem Licht sichtbar gemacht werden, wurden Gellösung und Elektrophoresepuffer Ethidiumbromid zugesetzt (Endkonzentration 1 µg·ml⁻¹), da nachträgliches "Anfärben" dieser Gele Schwierigkeiten macht (Chen-Kiang, pers. Mitt.). Ethidiumbromidgefärbte Banden sind in Agarose - Formaldehydgelen schlecht zu sehen. Kam es darauf an, auch schwächere Banden zu erkennen, wurden die Gele zweimal je 1 h mit 1 mM MgSO₄ (Maniatis *et al.*, 1982, S. 161) entfärbt.

Die ethanolgefällten RNAs wurden mit 80% Ethanol gewaschen, getrocknet und in je 40 µl Auftragspuffer (Maniatis *et al.*,

1982, S. 202) 15 min auf 55°C erhitzt, auf Eis abgeschreckt und auf das Gel aufgetragen.

Acrylamid - Harnstoffgele

Acrylamid - Harnstoffgele wurden zwischen zwei vertikale Glasplatten (16,4 cm · 13,4 cm, Abstand 3 mm) gegossen, wie in Maniatis *et al.* (1982, S. 174-177) beschrieben und bei Raumtemperatur vertikal gefahren. 150 ml Gellösung (ausreichend für 2 Gele) enthielten

25 ml 30% Acrylamid ⁴⁾ für 5%ige Gele
bzw. 50 ml 30% Acrylamid ⁴⁾ für 10%ige Gele
30 ml 10X TRIS·EDTA·Borat pH 8,3
72,1 g Harnstoff (Endkonzentration 8M)
3,15 ml 3% Ammoniumperoxodisulfat (PER)
ddH₂O -> 150 ml

Die Gellösung wurde unter Rühren im Wasserstrahlvakuum 1 min entgast und durch Zugabe von 45 µl N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) polymerisiert. Vor Gebrauch wurden die Gele einer 2 h Vorelektrophorese bei 100 V (7 V·cm⁻¹, Raumtemperatur) unterworfen. Die getrockneten - mit 80% Ethanol gewaschenen - RNA Proben wurden in je 40 µl deionisiertem Formamid (nach Maniatis *et al.*, 1982, S. 448) (mit 0,1% Xylencyanol und 0,1% Bromphenolblau) 5 min bei 65°C erhitzt, auf Eis abge-

⁴⁾ Acrylamid / N,N'-Methylenbisacrylamid 29+1

schreckt und auf das Gel aufgetragen.

In 5% Acrylamid - 8M Harnstoffgelen wanderte Bromphenolblau etwas schneller als tRNA. Deswegen wurde die Elektrophorese nach Herauswandern dieses Farbstoffes beendet. In 10% Acrylamid - 8M Harnstoffgelen wanderte Xylencyanol schneller als tRNA. Entsprechend wurde die Elektrophorese nach Herauslaufen dieses Farbstoffs beendet.

Als Längenstandards standen 5S rRNA aus *E. coli*, tRNA aus *E. coli* und Hefe sowie die URNAs 1 bis 6 (ohne U3) aus Ehrlich Ascites Tumorzellen zur Verfügung.

Sollten die Banden unter ultraviolettem Licht betrachtet werden, enthielten Gel und Elektrophoresepuffer je $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Ethidiumbromid. Da Harnstoff die Fluoreszenz stark unterdrückt, wurden die Gele anschließend zweimal 30 min mit 1 mM MgSO_4 (Maniatis *et al.*, 1982, S. 161) entfärbt.

Gelelektrophoretische Analyse der RNAs

Zerschneiden der Gele

$[^3\text{H}]$ markierte KernRNA wurde in 0,8% Agarose - 2,2M Formaldehydgel (S. 32) über Nacht bei $1,75 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$ und 4°C oder $1 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$ und Raumtemperatur elektrophoretisch aufgetrennt. In Gel und Elektrophoresepuffer befanden sich je $1 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ Ethidiumbromid. Die Elektrophorese wurde beendet, nachdem das Bromphenolblau vollständig aus dem Gel herausgewandert war. *E. coli* 16S rRNA verblieb dabei ca. 1 cm von der unteren Gelkante entfernt.

$[^3\text{H}]$ markierte RNA aus dem Cytoplasma wurde in 1,6% Agarose - 2,2M Formaldehydgel (S. 32) über Nacht bei $1,5 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$ und 4°C oder $1 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$ und Raumtemperatur elektrophoretisch aufgetrennt. Bromphenolblau wanderte in diesen Gelen etwas langsamer als tRNA. Deswegen wurde die Elektrophorese beendet, nachdem der Farbstoff noch ca. 2 cm von der unteren Gelkante entfernt war.

Unter ultraviolettem Licht wurden die einzelnen Bahnen sichtbar gemacht, parallel zur Laufrichtung mit einer Rasierklinge ausgeschnitten und senkrecht zur Laufrichtung mit einem Bio-Rad Gelschneidegerät - bestehend aus ca. 135 parallel angeordneten Rasierklingen - in ca. 130 Stückchen von ca. 1 mm Durchmesser zerschnitten. Jedes dieser Gelstückchen wurde in ein

Zählgläschen überführt, mit je 1 ml Soluene 350 versetzt und mindestens über Nacht bei 37°C auf einem Geltaumler bewegt.

Nach Zugabe von 10 ml Szintillationsflüssigkeit (S. 25) wurde die Radioaktivität der einzelnen Stückchen in einem Szintillationszähler 5 - 10 min pro Probe gemessen.

Das Hauptproblem dieser Methode lag jedoch im Auftreten von Chemolumineszenzreaktionen nach Zugabe der Szintillationsflüssigkeit. Diese führten kurz nach Zugabe der Zählflüssigkeit zu "Zählraten" von über 300 000 cpm ohne Radioaktivität! Daher wurden die Proben vor der Bestimmung ihrer Radioaktivität mehrere Stunden bzw. über Nacht bei 4°C zum Abklingen der Chemolumineszenz im Dunklen gehalten und nach Einbringen in den Szintillationszähler noch einmal ca. 1 h, bis mehrere Blindproben ohne Radioaktivität normale Zählhintergrundwerte zeigten. Nach mehrtägiger Lagerung verschwand jedoch die Lichtempfindlichkeit der Proben.

Um diese Schwierigkeiten - und nicht zuletzt die hohen Kosten (Soluene) - zu umgehen, wurden die Gelstückchen alternativ zu dieser Methode nach Überführung in Zählgläschen mindestens über Nacht bei 37°C unter Bewegung mit je 1 ml 0,1N NaOH / 0,1% SDS inkubiert. Jedes Zählgläschen wurde mit einem Whatman GF/C-Filter bestückt, die Lösung über Nacht bei ca. 70°C auf die Filter aufgetrocknet und in je 10 ml Szintillationsflüssigkeit (S. 25) gezählt. Nachteil dieser Methode war jedoch - in Anbetracht von ca. 520 Gelstückchen pro Experiment - ein erheblich größerer Arbeitsaufwand und eine um fast die Hälfte geringere Zählausbeute.

Zuordnung der RNA Banden

Die elektrophoretische Auftrennung von 1 OD [50 µg] isolierter KernRNA aus S49.1 Zellen zeigte in ethidiumbromidgefärbten 0,8% Agarose - 2,2 M Formaldehydgelen 7 Banden, die langsamer als *E. coli* 16S rRNA wanderten (Abb. 1).

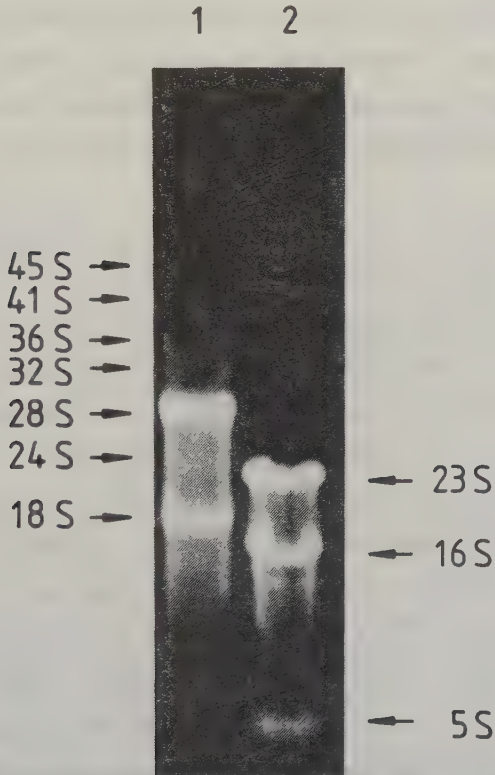


Abb. 1: Gelelektrophorese isolierter KernRNA aus S49.1-Zellen in einem 0,8% Agarose-2,2M Formaldehydgel. Elektrophoresedauer 20 h, 1,75 V·cm⁻¹, 4°C.

Spur 1: S49.1 KernRNA 1,0 OD [50 µg]

Spur 2: *E. coli* 23S- und 16S rRNA 0,6 OD [30 µg]

E. coli 5S rRNA 0,1 OD [5 µg]

Zwei intensiv fluoreszierende Banden lassen sich durch Vergleich mit *E. coli* 23S- und 16S rRNA, die als Längenstandards zur Verfügung standen, 28S- und 18S RNA zuordnen. Zudem wandern die beiden Banden erwartungsgemäß mit 28S- und 18S rRNA aus dem Cytoplasma der Zellen auf gleicher Höhe (ohne Beleg). Über der 28S RNA Bande sind vier weitere schwächere Banden zu erkennen, die den aus der Literatur bekannten ribosomalen VorläuferRNA Spezies 45S-, 41S-, 36S- und 32S RNA (Perry, 1976; Hadjiolov, 1980, 1985; siehe Fig. 1, S. 8) zugeordnet werden können. Eine schwache Bande zwischen 28S- und 18S RNA wanderte um ca. "ein S" langsamer als *E. coli* 23S rRNA und wurde daher

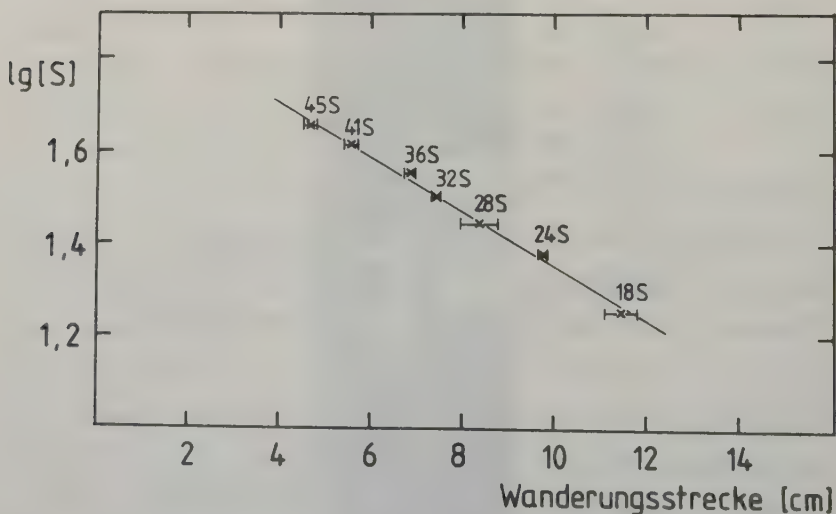


Fig. 3: Verhältnis des dekadischen Logarithmus der Svedberg-konstanten ribosomaler VorläuferRNAs zu ihrer Wanderungsstrecke in einem 0,8% Agarose-2,2M Formaldehydgel. Elektrophoresedauer 18 h, 1,75 V·cm⁻¹, 4°C. Die Fehlerbalken entsprechen der Breite der Banden (vgl. Abb. 1). 36S RNA liegt nur in diesem Beispiel außerhalb der errechneten Ausgleichsgeraden.

als 24S RNA bezeichnet. Ihre Herkunft blieb jedoch ungeklärt ⁵⁾.

Trägt man in einem Diagramm den dekadischen Logarithmus der zugeordneten Svedbergkonstanten der RNAs gegen ihre Wanderungsstrecke im Gel auf, erhält man - in Übereinstimmung mit Lehrach *et al.* (1977) - eine Gerade, wie sie in Fig. 3 exemplarisch für ein Gel gezeigt wird.

Die oberen vier Banden (45S-, 41S-, 36S- und 32S RNA) fluoreszieren etwa gleich intensiv. Ihr Vorkommen in den Zellen entspricht damit ungefähr dem Gehalt an VorläuferRNAs, den Hadjiolov (1985, S.91) für Rattenleber-Zellkerne angibt (Tab. 1).

Der Gehalt von 28S- und 18S RNA ist in der isolierten S49.1 - KernRNA (Abb. 1, S. 37) jedoch im Vergleich zu den VorläuferRNAs überhöht. Dazu ist jedoch anzumerken, daß durch die schonende Abtrennung der Zellkerne vom Cytoplasma (S. 28) sicherlich ein gewisser Anteil Cytoplasma von den Zellkernen eingeschlossen und weiterverarbeitet wurde, der aber - zumindest bei Versuchen mit kurzen Inkubationszeiten mit Radioaktivität - nicht störte. Eine deutliche radioaktive Markierung cytoplasmatischer RNA war erst nach längeren Inkubationszeiten zu erwarten und auch nach längeren Zeiten fiel dieser Anteil mengenmäßig kaum ins Gewicht (vgl. Ausbeuten S. 31 mit S. 30).

Außerdem wurde nicht versucht, die Zellkerne von ihrer äußeren - mit Ribosomen bestückten - Kernmembran zu befreien, da einer

⁵⁾ Es könnte sich bei dieser Bande um den abgetrennten externen transkribierten spacer (ETS, siehe Fig. 1, S. 8; S. 123) handeln, der in der Literatur öfters mit 24S RNA bezeichnet wird (Weinberg & Penman, 1970; Wellauer & David, 1973, 1975; Wellauer *et al.*, 1974; Winicov & Perry, 1975; Bach *et al.*, 1981; Bowman *et al.*, 1981)

möglichst schnellen Aufarbeitung der Vorzug gegeben wurde.

rRNA Spezies	10 ⁻⁴ Moleküle pro Zellkern
45S	1,2 ± 0,2
41S	0,9 ± 0,2
36S	1,2 ± 0,2
32S	2,9 ± 0,4
28S	9,6 ± 1,5
21S	2,5 ± 0,5 *)
18S	8,7 ± 1,7

Tab. 1: Gehalt ribosomaler RNAs und VorläuferRNAs in Rattenleber-Zellkernen.

Tabelle aus Dabeva *et al.* (1978) bzw. Hadjiolov (1985, S. 91).

*) Den Gehalt an 21S RNA gibt Hadjiolov als übertrieben ("overestimated") an.

Ein weiteres Indiz für die Richtigkeit dieser Zuordnung ist die Übereinstimmung der Bande mit der geringsten elektrophoretischen Mobilität - also 45S RNA - mit der RNA Bande, die nach kurzen Inkubationszeiten mit [³H]Methionin oder [³H]Uridin in unbehandelten Kontrollzellen hauptsächlich markiert wird und daher dem primären 45S RNA Transkript zuzuordnen ist.

Da kleinere Mengen RNA - wie Abb. 1 (S. 37) zeigt - in ethidiumbromidgefärbten Agarose - Formaldehydgelen schlecht zu erkennen waren, wurden insgesamt 5 Referenzläufe mit größeren Mengen "kalter" KernRNA (1 OD) für die Zuordnung der Banden statistisch ausgewertet.

Zuordnung der radioaktiv markierten Banden

28S- und 18S RNA waren aufgrund ihres mengenmäßigen Anteils auch auf den ethidiumbromidgefärbten, jedoch nicht entfärbten Agarose - Formaldehydgelen zu erkennen, auf denen [^3H]markierte RNA aufgetrennt wurde. Die Positionen dieser Banden wurden auf einem Polaroidfoto festgehalten und ließen sich später nach Zerschneiden der Gele rechnerisch den entsprechenden radioaktiven Banden in den Diagrammen zuordnen.

Der am langsamsten wandernde und - zumindest in unbehandelten Kontrollzellen nach kurzer radioaktiver Markierung - immer am stärksten markierte radioaktive Gipfel wurde dem 45S Primärtranskript zugeordnet.

Die Positionen der weiteren VorläuferRNA Banden aus Abb. 1 (S. 37) wurden rechnerisch auf die Diagramme der zerschnittenen radioaktiven Gele übertragen. Die Dicke der Pfeile, die in den Diagrammen die Lage der einzelnen RNA Spezies anzeigen, entsprechen hierbei der Dicke der Banden, wie sie in den Referenzläufen (Abb. 1) auftraten.

Fluorographie

Die Methoden der fluorographischen Bestimmung [^3H]markierter Nukleinsäuren und Proteine werden ausgezeichnet von Laskey (1984) beschrieben.

Agarose - Formaldehydgele

[^3H]markierte KernRNA und cytoplasmatische RNA wurden in 0,8% Agarose - 2,2M Formaldehydgel (S. 32) über Nacht bei 1 V $\cdot \text{cm}^{-1}$ und Raumtemperatur ohne Zugabe von Ethidiumbromid elektrophoretisch aufgetrennt, bis Bromphenolblau aus dem Gel herausgewandert war. Die Gele wurden unter vorsichtiger Bewegung auf einem Geltaumler 15 min in 7% Essigsäure in ddH_2O / Methanol 7+3 fixiert, 30 min unter Bewegung mit Amplify behandelt, anschließend zwei Stunden unter Wasserstrahlvakuum bei Raumtemperatur auf einem Whatman 3MM-Papier entwässert und schließlich 30 min bei ca. 60°C getrocknet. Sie blieben mindestens 30 min im Dunklen (Chemolumineszenz), bevor ein KODAK XAR-5 Röntgenfilm aufgelegt wurde, der bei -70°C exponiert wurde. KernRNA Banden waren nach 3 - 7 Tagen, Banden cytoplasmatischer RNA nach 4 - 6 Wochen ausreichend deutlich sichtbar. FUJI RX Röntgenfilme erwiesen sich hierbei gegenüber dem KODAK Röntgenfilm als nicht einmal halb so empfindlich. Die dominanten radioaktiven Banden von 45S-, 32S-, 28S- und 18S-RNA ließen sich mühelos durch Vergleich mit den radioaktiven Gipfeln der Diagramme der entsprechenden zerschnittenen Gele zuordnen.

Acrylamid - Harnstoffgele

[^3H]markierte KernRNA und cytoplasmatische RNA wurden über Nacht bei 40 V ($3 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$) und Raumtemperatur auf 5% Acrylamid-8M Harnstoffgelen oder bei 100 - 120 V ($7 - 8,5 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$) und Raumtemperatur auf 10% Acrylamid - 8M Harnstoffgelen (S. 33-34) ohne Zugabe von Ethidiumbromid aufgetrennt, bis Bromphe-

nolblau (bei 5% Gelen) bzw. Xylencyanol (bei 10% Gelen) aus dem Gel herausgewandert waren. Die Gele wurden - zur Entfernung von Harnstoff dreimal je 10 min - in 7% Essigsäure in ddH₂O / Methanol 7+3 unter Bewegung auf einem Geltaumler fixiert, 30 min mit Amplify behandelt und 4 h bei ca. 90°C unter Wasserstrahlvakuum auf Whatman 3MM Papier getrocknet. Ein KODAK XAR-5 Röntgenfilm wurde - wie oben beschrieben - 3 Tage (für KernRNA) bis zu 6 Wochen (für cytoplasm. RNA) exponiert. Als Längenstandards wurden 5S rRNA und tRNA aus *E. coli* und U1 - U6 snRNAs aus Ehrlich Ascites Tumorzellen links und rechts neben den "heißen" Bahnen aufgesetzt, nach der Elektrophorese mit einer Rasierklinge vom radioaktiven Teil des Gels abgetrennt, 30 min mit 1 µg·ml⁻¹ Ethidiumbromid gefärbt und zweimal je eine Stunde mit 1 mM MgSO₄ (Maniatis *et al.*, 1982, S. 161) entfärbt. Fotografierte man die "kalten", ethidiumbromidgefärbten Längenstandards unter ultraviolettem Licht mit einer Polaroidkamera und später die belichteten, entwickelten Röntgenfilme im gleichen Maßstab, ließen sich die einzelnen Banden mühelos einander zuordnen.

ERGEBNISSE

Wachstum von S49.1 Zellen

Ovalicin hemmt die Proliferation von S49.1 Zellen in Zellkultur, jedoch erst nach längerem Einwirken. Versetzt man exponentiell wachsende S49.1 Zellen mit Ovalicin einer Endkonzentration von $2 \cdot 10^{-7} \text{M}$ und bestimmt in Abständen von je einem Tag die Konzentration lebender, nach Vitalfärbung (S. 19) farbloser Zellen, kann 22 h nach Zugabe (ca. 1 Zellzyklus) auf diese Art und Weise keine statistisch nachweisbare Wachstumshemmung im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen festgestellt werden (Fig. 4). Selbst eine Erhöhung der Ovalicinkonzentration um das 100fache auf $2 \cdot 10^{-5} \text{M}$ zeigt einen Tag nach Einwirken keine Abnahme der Zelldichte ovalicinbehandelter Zellen, verglichen mit Kontrollzellen (Diersch, 1982). Jedoch lassen sich bereits 16 - 17 h nach Zugabe der Droge durchschnittlich 17% ($\pm 5\%$) der Zellen mit Trypanblau (S. 19) anfärben. Die Zellen sind also tot oder zumindest geschädigt. Bei unbehandelten Kontrollzellen sind es dagegen nur 6% ($\pm 3\%$; ohne Beleg). 46 h nach Zugabe (ca. 2,5 Zellzyklen) ist die Hemmung der Proliferation offensichtlich und drei bzw. vier Tage nach Zugabe nimmt die Zelldichte der Kultur bereits stetig ab. 4 Tage nach Zugabe der Droge sind mindestens 90% der Zellen tot (Kontrollzellen 2,4%, ohne Beleg), und spätestens eine Woche nach Zugabe sind alle Zellen tot. Zur Diskussion der Wachstumskurve siehe S. 151 - 152.

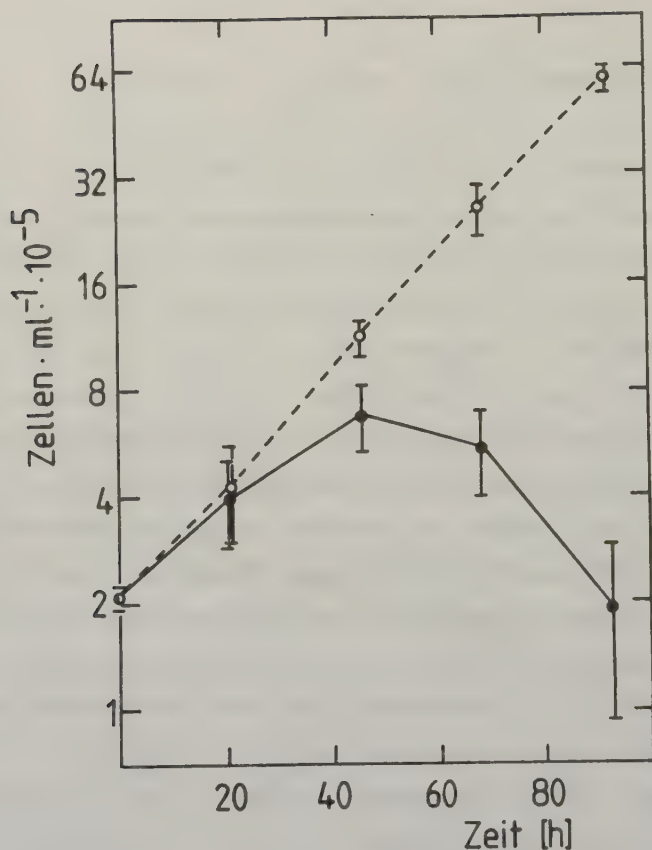


Fig. 4: Einfluß von Ovalicin auf das Wachstum von S49.1 Zellen

Zelldichte in Gegenwart von $2 \cdot 10^{-7} \text{M}$ Ovalicin ($\bullet$, —),
 Zelldichte der unbehandelten Kontrollzellen ($\circ$, ----).
 Es wurden nur lebende Zellen gezählt (Vitalfärbung). Kontroll-
 zellen wurden nach Erreichen einer Zelldichte von ca. $2 \cdot 10^6$
 Zellen $\cdot \text{ml}^{-1}$ einmal 1+3 mit frischem Medium verdünnt, ovalicin-
 behandelte Zellen erreichten diese Zelldichte gar nicht. Die
 Teilungsrates unbehandelter Kontrollzellen betrug im Durch-
 schnitt 19 h. Zugabe der Droge bei $t = 0$.

RNA Gehalt

Aus früheren Versuchen mit S49.1 Zellen war bekannt, daß die Zugabe von Ovalicin in einer Konzentration von $2 \cdot 10^{-7} \text{M}$ zum Kulturmedium zu einer Verringerung des Gehalts an Ribosomen führt (verglichen mit unbehandelten Kontrollzellen). 6 h und 12 h nach Zugabe der Droge konnte keine statistisch abgesicherte Abnahme der Ribosomenzahl gemessen werden. 18 h nach Zugabe von Ovalicin wurden jedoch nur noch 73% ($\pm 13\%$) des Kontrollribosomengehaltes gemessen und 21 h und 24 h nach Zugabe jeweils 80% ($\pm 19\%$) bzw. 75% ($\pm 18\%$) (Diersch, 1982).

Ob eine Abnahme des Gehalts ribosomaler RNA schon am Ort ihrer Entstehung - im Zellkern - gemessen werden kann, war dagegen noch unbekannt. Daher wurden S49.1 Zellen in acht voneinander unabhängigen Versuchen 18 h lang $2 \cdot 10^{-7} \text{M}$ Ovalicin ausgesetzt, aus ihnen und unbehandelten Kontrollzellen RNA aus den Zellkernen isoliert, und zur optischen Bestimmung der RNA verwendet (Chirgwin, 1979). Dabei kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß nach der DNase I-Behandlung anfallende und durch Ethanol fällbare DNA Oligonukleotide mitgemessen wurden.

Bezogen auf die optische Dichte isolierter KernRNA aus unbehandelten Kontrollzellen ($\approx 100\%$) wurden aus den Zellkernen von S49.1 Zellen, die 18 h $2 \cdot 10^{-7} \text{M}$ Ovalicin ausgesetzt waren, bezogen auf die gleiche Zellzahl 67 - 96% der optischen Dichte gemessen (Tab. 2). Der Mittelwert der Messungen lag bei 86% der optischen Dichte mit einer Standardabweichung s (Bergmeyer, 1977) von 10%.

Versuchs- bezeichnung	RNA Gehalt ovalicinbehan- delter Zellen [OD/10 ⁶ Zellen]	RNA Gehalt unbehandelter Kontrollzellen [OD/10 ⁶ Zellen]	%
M30	0,07 [3,7 µg]	0,11 [5,6 µg]	67%
M40	0,13 [6,5 µg]	0,14 [6,8 µg]	96%
M60	0,17 [8,3 µg]	0,18 [8,8 µg]	95%
M90	0,22 [11 µg]	0,26 [13 µg]	88%
U30/5	0,40 [20 µg]	0,42 [21 µg]	95%
U30/6	0,44 [22 µg]	0,55 [27 µg]	81%
U60/3	0,30 [15 µg]	0,34 [17 µg]	86%
U90	0,31 [16 µg]	0,38 [19 µg]	81%

Tab. 2: **Einfluß von Ovalicin auf den RNA Gehalt von S49.1-Zellkernen.**

Messung der optischen Dichte isolierter KernRNA aus Zellen, die 18 h $2 \cdot 10^{-7} M$ Ovalicin ausgesetzt waren und unbehandelten Kontrollzellen bezogen auf 10^6 Zellen aus acht voneinander unabhängigen Pulsmarkierungsexperimenten (siehe Tab. 3 & 5). Gemessen wurden 10-25% der Ausbeute, auf 100% berechnet und durch die Anzahl der aufgearbeiteten Zellen dividiert. Optische Dichte der KernRNA aus unbehandelten Kontrollzellen = 100%.

Die Abnahme des RNA Gehalts in den Zellkernen ovalicinbehandelter Zellen ist damit gerade noch statistisch abgesichert (siehe auch Diskussion S. 126 - 127, S. 140 - 141). Sie liegt jedoch mit 14% um die Hälfte unter der - unter den gleichen Bedingungen - gemessenen 27%igen Abnahme der Zahl der Ribosomen im Cytoplasma. Dies kann als Hinweis darauf gewertet werden, daß außer einer verminderten Syntheserate von KernRNA - die bei diesem Versuch ja gar nicht gemessen wurde - noch weitere Faktoren die Verminderung der Ribosomenzahl bewirken (siehe Diskussion S. 140 - 141).

RNA Syntheserate

Um den Einfluß von Ovalicin auf die Syntheserate von KernRNA messen zu können, wurden S49.1 Zellen nach 18 h Inkubation (einschließlich der Pulsmarkierungsdauer) mit $2 \cdot 10^{-7} \text{M}$ Ovalicin in vier Versuchen 30, 60 und 90 min je 250 μCi [^3H]Uridin angeboten und anschließend Radioaktivität und optische Dichte der isolierten KernRNA mit KernRNA aus unbehandelten Kontrollzellen verglichen (Tab. 3).

Versuchs- bezeich- nung	Inkubation [^3H]Uridin [min]	[^3H]Uridineinbau in		%
		ovalicinbehan- delte Zellen [cpm/ 10^6 Zellen] $\cdot 10^{-5}$	unbehandelte Kontrollzellen [cpm/ 10^6 Zellen] $\cdot 10^{-5}$	
U30/5	30 min	7,6	9,3	81%
U30/6	30 min	5,8	8,7	67%
U60/3	60 min	9,1	12	76%
U90	90 min	11	16	67%

Tab. 3: Einfluß von Ovalicin auf die RNA Syntheserate von S49.1 Zellen.

Messung der Radioaktivität isolierter KernRNA aus Zellen, die 18 h $2 \cdot 10^{-7} \text{M}$ Ovalicin ausgesetzt waren und unbehandelten Kontrollzellen bezogen auf 10^6 Zellen aus vier voneinander unabhängigen Versuchen. $1,3\text{--}1,6 \cdot 10^7$ Zellen in je 11,6 ml Kulturmedium wurden 30–90 min mit je 250 μCi [^3H]Uridin markiert. Radioaktivität der KernRNA aus unbehandelten Kontrollzellen = 100%.

In isolierter RNA aus Zellkernen ovalicinbehandelter Zellen wurden dabei nach Inkubation mit [^3H]Uridin 67 – 81% der Ra-

radioaktivität gemessen, die - bezogen auf gleiche Zellzahl - in den Kontrollzellen gefunden wurde (Tab. 3). Ein Einfluß der Dauer der radioaktiven Markierungsperiode auf die Syntheserate konnte nicht festgestellt werden, wohl auch durch die Streuung der Werte, auf die beide Experimente mit 30 min Markierungsdauer hinweisen. Die Verminderung der Syntheserate von KernRNA in ovalicinbehandelten Zellen ist jedoch signifikant und beträgt - gemittelt über die vier Experimente - $73 \pm 7\%$.

Hierbei ist noch nicht berücksichtigt, daß aus den Kernen von Zellen, die Ovalicin ausgesetzt waren, auch weniger RNA isoliert wurde. Daher wurde die spezifische Radioaktivität (=Radioaktivität der RNA dividiert durch ihre optische Dichte) der GesamtkernRNA aus ovalicinbehandelten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen errechnet (Tab. 4).

Auffallend liegen alle Meßwerte der spezifischen Radioaktivität von KernRNA aus ovalicinbehandelten Zellen unabhängig von der Dauer der radioaktiven Markierung mit einer geringen Streuung bei $85 \pm 2\%$ (Tab. 4) (Zur Diskussion dieses Ergebnisses siehe S. 129, S. 131).

Markiert man KernRNA *in vivo* mit radioaktivem Uridin, mißt man jedoch nicht nur die Synthese ribosomaler RNA, denn nach Brandhorst & McConkey (1974) entfallen - in Mäuse-L Zellen - nur 39% der gesamten RNA Synthese im Zellkern auf die rRNA - Vorläufer und 58% auf heterogene KernRNA (hnRNA). Daß auch andere - nichtribosomale - hochmolekulare RNA Spezies durch radioaktives Uridin schon nach kurzer Zeit markiert werden (Greenberg & Penman, 1966) und dadurch die Analyse des Metabolismus ribosomaler RNA erschweren, ist schon lange bekannt.

Versuchs- bezeich- nung	Inkubation [³ H]Uridin [min]	spezifische Radioaktivität		%
		ovalicinbehan- delter Zellen [cpm/OD] ·10 ⁻⁶	unbehandelter Kontrollzellen [cpm/OD] ·10 ⁻⁶	
U30/5	30 min	1,9	2,2	86%
U30/6	30 min	1,3	1,6	84%
U60/3	60 min	3,1	3,5	88%
U90	90 min	3,5	4,2	83%

Tab. 4: Einfluß von Ovalicin auf die spezifische Radioaktivität von KernRNA aus S49.1 Zellen.

Berechnung der spezifischen Radioaktivität isolierter KernRNA aus Zellen, die 18 h $2 \cdot 10^{-7}$ M Ovalicin ausgesetzt waren und unbehandelten Kontrollzellen aus vier voneinander unabhängigen Versuchen. $1,3-1,6 \cdot 10^7$ Zellen in je 11,6 ml Kulturmedium wurden 30-90 min mit je 250 μ Ci [³H]Uridin markiert. Division der Werte aus Tab. 3 durch die Werte der Tab. 2. Spezifische Radioaktivität der KernRNA aus unbehandelten Kontrollzellen = 100%.

Diese Schwierigkeiten können umgangen werden, wenn man ausnützt, daß ribosomale RNAs bzw. ihre Vorläufer als einzige hochmolekulare RNA schnell und an zahlreichen Stellen methyliert werden (Greenberg & Penman, 1966; Maden & Salim, 1974; Khan *et al.*, 1978).

Methylierungsgeschwindigkeit ribosomaler RNA

Ribosomale VorläuferRNA wird während oder kurz nach der Transkription an ca. 110 spezifischen Stellen (in Säugetieren) methyliert ¹⁾ (Maden *et al.*, 1977; Khan *et al.*, 1978; Obara *et al.*, 1982; Hadjiolov, 1985, S. 88). Da das 45S Primärtranskript auch die einzige hochmolekulare RNA Spezies ist, die schnell methyliert wird (Greenberg & Penman, 1966; Weinberg *et al.*, 1967; Zimmerman & Holler, 1967) und sich durch den hohen Grad der Methylierung auszeichnet, mißt man durch Pulsmarkierung der Zellen mit [methyl-³H]Methionin vor allem die Methylierungsgeschwindigkeit ribosomaler RNA. Der Einbau in hnRNA und mRNA beträgt nach Wolf & Schlessinger (1977) ein sechstel des Einbaus in rRNA und pre rRNA. Die Methylierung von tRNA beträgt nach 30 min Markierung ca. 10% der ribosomalen RNA (ohne Beleg), ihre Synthese wird jedoch von Ovalicin nicht - oder zumindest in geringerem Maße - beeinflußt (Zimmermann & Hartmann, 1981).

Behandelt man S49.1 Zellen 18 h (einschließlich der Pulsmarkierungsdauer) mit $2 \cdot 10^{-7}$ M Ovalicin und inkubiert sie parallel zu unbehandelten Kontrollzellen nach Überführung in methioninfreies Kulturmedium verschiedene Zeiten mit je 2,5 mCi [methyl-³H] Methionin, so findet man - bezogen auf die gleiche Zellzahl - in der isolierten KernRNA ovalicinbehandelter Zellen in Abhängigkeit von der Markierungsdauer ²⁾ 64 - 78% der

¹⁾ zu 80-90% wird die 2'OH-Gruppe des Riboserestes methyliert
²⁾ Diese zeitliche Abnahme kann erklärt werden; siehe Diskussion S. 140 - 141

Radioaktivität, die man in Kontrollzellen mißt (Tab. 5). Die stärkste Abnahme der Methylierungsrate beobachtet man mit 36% bei der kürzesten Pulsmarkierungsdauer. Dieser Effekt nimmt mit längeren Markierungszeiten ab, ist mit einer 22%igen Abnahme der Methylierungsrate nach 90 min jedoch immer noch signifikant. Die durchschnittliche Abnahme beträgt $70 \pm 6\%$ und liegt damit in der Größenordnung, die für die Abnahme der RNA Synthese nach Markierung mit $[^3\text{H}]\text{Uridin}$ gemessen wurde (Tab. 3).

Versuchs- bezeich- nung	Inkubation [methyl- ^3H]Methio- nin[min]	Einbau von $[^3\text{H}]\text{Methionin}$ in		%
		ovalicinbehan- delte Zellen [cpm/ 10^6 Zellen] $\cdot 10^{-4}$	unbehandelte Kontrollzellen [cpm/ 10^6 Zellen] $\cdot 10^{-4}$	
M30	30 min	1,3	2,0	64%
M40	40 min	3,7	5,5	67%
M60	60 min	9,4	13	70%
M90	90 min	12	16	78%

Tab. 5: Einfluß von Ovalicin auf die Methylierungsgeschwindigkeit methylmarkierter S49.1 KernRNA.

Messung der Radioaktivität isolierter KernRNA aus Zellen, die $18\text{ h } 2 \cdot 10^{-7}\text{M}$ Ovalicin ausgesetzt waren und unbehandelten Kontrollzellen bezogen auf 10^6 Zellen aus vier voneinander unabhängigen Versuchen. $2,2\text{--}2,3 \cdot 10^7$ Zellen in je 11,7 ml methioninfreiem Kulturmedium wurden 30–90 min mit je 2,5 mCi [methyl- ^3H]Methionin markiert. Radioaktivität der KernRNA aus unbehandelten Kontrollzellen = 100%.

Auch bei diesen Experimenten wurde die spezifische Radioaktivität der isolierten GesamtkernRNA ovalicinbehandelter Zellen

berechnet und mit der aus Kontrollzellen ($\approx 100\%$) verglichen. Danach findet man nach der [methyl- ^3H] Methioninmarkierung 70 - 95% der spezifischen Radioaktivität (Tab. 6). Der Mittelwert der Messungen liegt bei $82 \pm 12\%$ und liegt damit ebenfalls in der Größenordnung, die nach der entsprechenden Markierung mit [^3H]Uridin gefunden wurde (85%, Tab. 4).

Versuchs- bezeich- nung	Inkubation [methyl- ^3H]Methio- nin[min]	spezifische Radioaktivität		%
		ovalicinbehan- delter Zellen [cpm/OD] $\cdot 10^{-5}$	unbehandelter Kontrollzellen [cpm/OD] $\cdot 10^{-5}$	
M30	30 min	1,7	1,8	95%
M40	40 min	2,9	4,1	70%
M60	60 min	5,7	7,6	74%
M90	90 min	5,6	6,2	89%

Tab. 6: Einfluß von Ovalicin auf die spezifische Radioaktivität methylmarkierter KernRNA aus S49.1 Zellen. Berechnung der spezifischen Radioaktivität isolierter KernRNA aus Zellen, die 18 h $2 \cdot 10^{-7}\text{M}$ Ovalicin ausgesetzt waren und unbehandelten Kontrollzellen aus vier voneinander unabhängigen Versuchen. $2,2\text{--}2,3 \cdot 10^7$ Zellen in je 11,7 ml methioninfreiem Kulturmedium wurden 30-90 min mit je 2,5 mCi [methyl- ^3H]Methionin markiert. Division der Werte aus Tab. 5 durch die Werte der Tab. 2. Spezifische Radioaktivität der KernRNA aus unbehandelten Kontrollzellen = 100%.

Auch diese Methode hat ihre Nachteile, denn zwischen Synthesegeschwindigkeit und Methylierungsrate kann nicht unterschieden werden und Rückschlüsse auf eine Hemmung der Synthese sind streng genommen nicht zulässig. Dennoch liefern beide Verfahren - die Messung der RNA Syntheserate durch den Einbau von

Uridin und die Messung der Methylierungsrate durch Methylierung mit Methionin - qualitativ das gleiche Ergebnis: die Synthese und / oder Methylierung ribosomaler RNA ist in S49.1-Zellen, die 18 h $2 \cdot 10^{-7} \text{M}$ Ovalicin ausgesetzt waren, um 27 bis 30% vermindert.

Die spezifische Radioaktivität der RNA ist - unabhängig vom angebotenen radioaktiven Vorläufermolekül - ebenfalls um 15 bis 18% vermindert.

Zur Diskussion dieser Ergebnisse siehe S. 128 - 131.

Aufnahme von Uridin

Zellen, die 18 h $2 \cdot 10^{-7} \text{M}$ Ovalicin ausgesetzt waren und unbehandelte Kontrollzellen wurden 60 min mit je 250 μCi [^3H]Uridin inkubiert. Unmittelbar nach Zugabe des Nukleosids und nach erfolgter Markierung nach dem Abzentrifugieren der Zellen wurden dem Kulturmedium je dreimal 10 μl entnommen und dessen Radioaktivität gemessen (Tab. 7).

	[^3H]Uridinkonzentration in Medium		verbliebene Radioakt. [%]
	vor Markierung [cpm $\cdot 10^{-6}/\text{ml}$]	nach Markierung [cpm $\cdot 10^{-6}/\text{ml}$]	
Ovalicin- kultur	15,7	12,7	81%
Kontroll- kultur	15,8	10,6	67%

Tab. 7: Aufnahme von radioaktivem Uridin aus dem Kulturmedium.

Je $1,5 \cdot 10^7$ Zellen in 11,6 ml Medium wurden 60 min mit je 250 μCi [^3H]Uridin inkubiert. Bestimmung der Radioaktivität des Mediums vor und nach der Markierung. Ovalicinbehandelte Zellen waren 18 h der Droge ($2 \cdot 10^{-7} \text{M}$) ausgesetzt. Die Verdünnung des Kulturmediums durch Zugabe des Vanadylkomplexes (S. 28) wurde rechnerisch berücksichtigt.

Vor der Aufnahme durch die Zellen wurde in beiden Kulturmedien annähernd die gleiche Radioaktivität gemessen (Tab. 7). Nach

der Markierung verblieben im Medium, das Ovalicin enthielt, 81% und im Medium der Kontrollzellen 67% der Radioaktivität.

Ovalicinbehandelte Zellen hatten also mit 19% fast um die Hälfte weniger angebotenes radioaktives Uridin aufgenommen als die Kontrollzellen mit 33%.

Markierte man die Zellen 90 min mit $[^3\text{H}]$ Uridin, nahmen ovalicinbehandelte Zellen 34% der im Medium enthaltenen Radioaktivität auf, Kontrollzellen 46% (ohne Beleg).

Zellen, die der Droge ausgesetzt waren, entnahmen damit dem Kulturmedium nach 90 min etwa soviel Radioaktivität wie unbehandelte Kontrollzellen nach 60 min.

Die Aufnahmegeschwindigkeit von $[^3\text{H}]$ Uridin in ovalicinbehandelten Zellen betrug während 60 min $5,0 \cdot 10^4 \text{ cpm} \cdot \text{min}^{-1}$ (57% der Kontrolle mit $8,8 \cdot 10^4 \text{ cpm} \cdot \text{min}^{-1}$, Tab. 7) und während 90 min $4,7 \cdot 10^4 \text{ cpm} \cdot \text{min}^{-1}$ (67% der Kontrolle mit $7,0 \cdot 10^4 \text{ cpm} \cdot \text{min}^{-1}$; ohne Beleg).

Ovalicin scheint also die Aufnahme von $[^3\text{H}]$ Uridin durch die Zellen zu verlangsamen. In diesem Experiment kann jedoch nicht unterschieden werden, ob Ovalicin die Aufnahme von $[^3\text{H}]$ Uridin durch die Zellen aktiv hemmt oder die Verminderung auf Rückkopplungseffekten durch Ereignisse im Zellinneren beruht (siehe Diskussion S. 129).

Aufnahme von Methionin

Wurden S49.1 Zellen unter den oben beschriebenen Bedingungen 60 min mit [methyl- ^3H]Methionin markiert, so entnahmen ovalicinbehandelte Zellen dem Medium 14% der angebotenen Radioaktivität, Kontrollzellen 17% (Tab. 8).

Die Aufnahme der Radioaktivität durch die Zellen ist gering, die Unterschiede sind nicht signifikant und Effekte durch die verminderte Aufnahme einer Aminosäure müßten auf Ebene der Proteine diskutiert werden, die jedoch nicht Untersuchungsgegenstand dieser Arbeit waren.

	[^3H]Methioninkonz. im Medium vor Markierung [cpm $\cdot 10^{-6}$ /ml]	nach Markierung [cpm $\cdot 10^{-6}$ /ml]	verbliebene Radioakt. [%]
Ovalicin- kultur	40,5	34,7	86%
Kontroll- kultur	41,8	34,7	83%

Tab. 8 : Aufnahme von radioaktivem Methionin aus dem Kulturmedium.

$2,5 \cdot 10^7$ Zellen (Ovalicin kultur) bzw. $2,4 \cdot 10^7$ Zellen (Kontrollkultur) in 11,4 ml methioninfreiem Medium wurden 60 min mit je 500 μCi [methyl- ^3H]Methionin inkubiert. Bestimmung der Radioaktivität des Kulturmediums vor und nach der Markierung. Ovalicinbehandelte Zellen waren 18 h der Droge ($2 \cdot 10^{-7}\text{M}$) ausgesetzt.

Prozessieren ribosomaler RNA

Um den Metabolismus ribosomaler RNA näher untersuchen zu können, wurde aus ovalicinbehandelten Zellen und Kontrollzellen aus den Zellkernen und aus dem Cytoplasma radioaktiv markierte RNA isoliert und durch Gelelektrophorese auf Agarose - Formaldehydgelen aufgetrennt. Dabei wurde wiederum ausgenützt, daß 45S pre RNA als einzige hochmolekulare RNA schnell und an vielen Stellen methyliert wird (Greenberg & Penman, 1966; Klagsbrun, 1973; Khan *et al.*, 1978). Es werden jedoch nur die Bereiche des Primärtranskripts methyliert, die nach dem Prozessieren als "reife" RNA in den Ribosomen vorliegen. Transkribierte Spacerregionen werden nicht methyliert (Weinberg & Penman, 1970; Maden & Salim, 1974; Maden *et al.*, 1977).

Markiert man also ribosomale RNA mit [methyl- ^3H]Methionin *in vivo*, "sieht" man nur ribosomale RNA und ihre Vorläufermoleküle, nicht dagegen abgetrennte Spacersequenzen und andere RNA - Spezies (mit Ausnahmen, z.B. [^3H]met-tRNA_{met}).

In einem ersten Experiment wurden S49.1 Zellen mit und ohne Ovalicin 20 min in methioninfreiem Medium mit je 1,85 mCi [methyl- ^3H]Methionin markiert. Ovalicinbehandelte Zellen waren zuvor nach 18 h Inkubationszeit durchschnittlich 56 % der Dauer eines Zellzyklus (in diesem Experiment 32 h) der Droge ausgesetzt. Ein Teil der isolierten KernRNA wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Verteilung der eingebauten Radioaktivität auf die einzelnen Banden analysiert. In beiden Fällen (mit und ohne Ovalicin) wurde im wesentlichen eine deut-

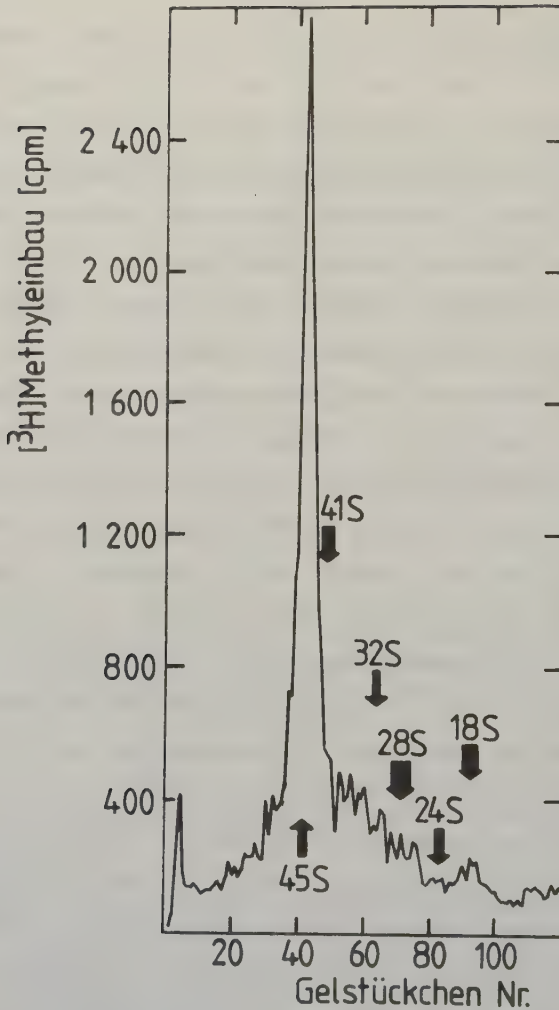


Fig. 5: Gelelektrophorese von KernRNA aus ovalicinbehandelten S49.1 Zellen nach 20 min Pulsmarkierung mit [methyl- ^3H]Methionin.

0,8% Agarose - 2,2M Formaldehydgel. Elektrophoresedauer 24 h bei $1,4 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$ und 4°C . $2,3 \cdot 10^7$ Zellen in 11,7 ml methionin-freiem Medium wurden 20 min mit 1,85 mCi [methyl- ^3H]Methionin inkubiert. Ovalicinbehandlung $2 \cdot 10^{-7}\text{M}$, 18 h (= 56 % des Zellzyklus, in diesem Experiment 32 h). Aufgesetzt wurden 40 % der isolierten KernRNA (92% der Kontrolle). Radioaktivitätsbestimmung mit Soluene 350 (S. 35-36), Szintillationszählung 5 min.

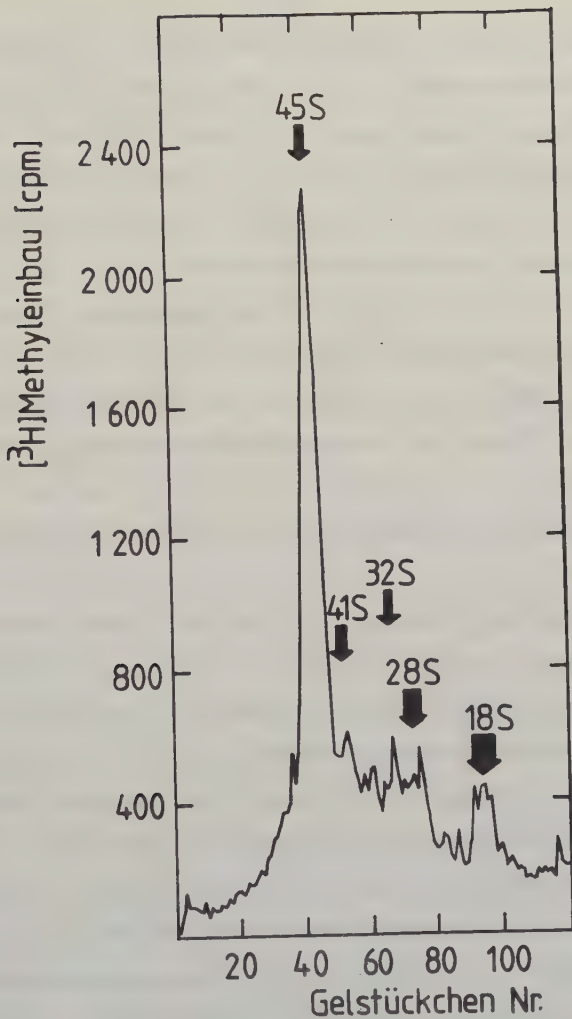


Fig. 6: Gelelektrophorese von KernRNA aus unbehandelten Kontrollzellen nach 20 min Pulsmarkierung mit $[\text{methyl-}^3\text{H}]\text{Methionin}$.

0,8% Agarose - 2,2M Formaldehydgel. Elektrophoresedauer siehe Fig. 5. $2,3 \cdot 10^7$ Zellen in 11,7 ml methioninfreiem Medium wurden 20 min mit 1,85 mCi $[\text{methyl-}^3\text{H}]\text{Methionin}$ inkubiert. Aufgesetzte Menge und Radioaktivitätsbestimmung siehe Fig. 5. Die Pfeile markieren die Positionen der Banden, die durch Ethidiumbromid sichtbar gemacht werden können (siehe Abb. 1, S. 37).

lich markierte Bande beobachtet (Fig. 5 & 6), die dem 45S Primärtranskript zugeordnet werden konnte, das als einzige hochmolekulare RNA schnell methyliert wird (Greenberg & Penman, 1966). Außerdem zeigte sie das gleiche elektrophoretische Wanderungsverhalten wie die langsamste Bande, die nach Anfärben von KernRNA mit Ethidiumbromid beobachtet (Abb. 1, S. 37) und unabhängig von der radioaktiven Markierung der 45S pre rRNA zugeordnet werden konnte (siehe S. 37-40). Addiert man die Radioaktivität der Gelstückchen, die den dominanten 45S RNA Gipfel bilden, erhält man für die Bande aus ovalicinbehandelten Zellen 17 100 cpm (Gelstückchen Nr. 36-48) und für die entsprechende Bande der Kontrollzellen 17 000 cpm (Gelstückchen Nr. 37-49).

Zu berücksichtigen ist jedoch, daß aus ovalicinbehandelten Zellen weniger RNA isoliert und damit auch weniger RNA auf das Gel aufgesetzt wurde. Dadurch erhöht sich die spezifische Radioaktivität der markierten Bande noch etwas gegenüber der Kontrolle. Die optische Bestimmung des RNA Gehalts wurde bei diesem Experiment leider durch einen Restanteil des Vanadylribonukleosidkomplexes verfälscht (siehe S. 23). Unter der Annahme, daß die Assoziation des Vanadylkomplexes proportional zum RNA Gehalt ist, wurden aus ovalicinbehandelten S49.1 Zellen 92% der KernRNA gegenüber den Kontrollzellen isoliert. Damit wurde in 45S pre rRNA ovalicinbehandelter Zellen - entgegen dem Resultat für GesamtkernRNA (Tab. 5, S. 53) - etwas mehr Radioaktivität eingebaut als in die entsprechende RNA der Kontrollzellen.

Dieser Befund kann so interpretiert werden, daß Ovalicin die

Methylierung des Primärtranskriptes nicht hemmt. Neben der dominant markierten 45S RNA finden sich kleine, schwach markierte Banden, die sich - am deutlichsten im Gel der RNA der Kontrollzellen (Fig. 6) - den Prozessierungsprodukten 41S-, 36S-, 32S-, 28S- und 18S RNA zuordnen lassen. Dies deutet darauf hin, daß bereits 20 min nach Methylierung des Primärtranskriptes dessen Prozessierung begonnen hat. Relativ deutlich im Gel der RNA der Kontrollzellen (Fig. 6) ist 18S RNA markiert (Gelstückchen Nr. 90-98, 3 310 cpm), deren schnelle Entstehung durch das Prozessierungsschema (Fig. 1, S. 8) ¹⁾ erklärbar ist ²⁾.

Die prozessierten RNA Spezies sind in ovalicinbehandelten Zellen etwas weniger radioaktiv markiert. So ist 18S RNA (Gelstückchen Nr. 87-95; Fig. 5) mit 1 670 cpm etwa halb so stark markiert wie die entsprechende RNA der Kontrollzellen (Fig. 6). Dies könnte eine durch Ovalicin verursachte Verlangsamung der Prozessierungsgeschwindigkeit bedeuten.

Nach Karagyozev *et al.* (1980) beträgt die Synthesegeschwindigkeit für das 45S Vorläufermolekül *in vivo* 715 Nukleotide pro Minute (in Rattenleber); die Synthese des 13 000 Basen langen Moleküls wäre demnach nach 18 min beendet ³⁾. Übernimmt man diesen Wert und berücksichtigt außerdem, daß die Zellen in

¹⁾ Das Prozessieren der rRNA verläuft in S49.1 Zellen wahrscheinlich nach dem "Mäuse-L Zellweg" (Fig. 1, S. 8); siehe Diskussion S. 133.

²⁾ in 18S RNA menschlicher HeLa Zellen werden 40 Ribosereste auf der Ebene der 45S RNA methyliert, 6 Basen jedoch später in der Reifung (Maden & Salim, 1974). Diese späte Methylierung macht demnach nur 13% der Markierung aus und kann die schnelle Markierung von 18S RNA nicht alleine erklären

³⁾ Diesbezügliche Angaben schwanken in der Literatur jedoch erheblich. So geben Bachellerie *et al.* (1975) 3 min für die Synthese von 45S RNA in Zajdela Ascitic Hepatomazellen der Ratte an.

diesem Experiment durch die häufigen Manipulationen nicht optimal wuchsen, muß davon ausgegangen werden, daß während der 20 min Pulsmarkierung mit [methyl- ^3H]Methionin kein vollständiges 45S RNA Molekül in den Zellen synthetisiert werden konnte und daher Aussagen über eine mögliche Hemmung der Synthese des Vorläufermoleküls durch Ovalicin aus diesem Experiment nicht möglich sind.

Um den weiteren Verlauf der Prozessierung des 45S Primärtranskriptes verfolgen zu können, wurden S49.1 Zellen im folgenden Experiment mit und ohne Ovalicin in methioninfreiem Kulturmedium 30 min mit je 2,5 mCi [methyl- ^3H]Methionin markiert und die Verteilung der eingebauten Radioaktivität in die RNA der Zellkerne und des Cytoplasmas wie beschrieben analysiert.

Zellen, die zuvor 18 h $2 \cdot 10^{-7}\text{M}$ Ovalicin ausgesetzt waren, teilten sich in diesem Experiment durchschnittlich alle 23 h und standen daher 79% ihres Zellzyklus unter dem Einfluß der Droge. Betrachtet man die KernRNA, die aus ovalicinbehandelten Zellen isoliert wurde, findet man neben einer dominant markierten 45S RNA Bande (Gelstückchen Nr. 23-32, 17 700 cpm) wieder weitere kürzere [^3H]markierte RNA Spezies (Fig. 7). Zu identifizieren sind radioaktiv markierte 32S RNA (Gelstückchen Nr. 41-47, 6 280 cpm), 28S RNA (Gelstückchen Nr. 49-56, 3 850 cpm) und 18S RNA (Gelstückchen Nr. 64-70, 3 240 cpm). In der aus Kontrollzellen isolierten KernRNA (Fig. 8) findet man ebenso 45S pre rRNA am stärksten markiert (Gelstückchen Nr. 25-34, 24 800 cpm), jedoch höher markierte Prozessierungsprodukte und außerdem einen zusätzlichen Gipfel, der 41S pre rRNA

zugeordnet werden kann (Gelstückchen Nr. 34-41, 14 300 cpm). Daneben findet man [^3H]markierte 32S RNA (Gelstückchen Nr. 41-47, 11 400 cpm), 28S RNA (Gelstückchen Nr. 48-55, 11 600 cpm) und Radioaktivität im 18S Bereich (Gelstückchen Nr. 64-70, 6 140 cpm). Diese Daten sind in Tab. 9 zusammengefaßt.

Die Methylierung ribosomaler RNA findet fast ausschließlich auf der Ebene der 45S RNA statt (Greenberg & Penman, 1966; Zimmerman & Holler, 1967; Maden & Salim, 1974; Hadjiolov, 1985, S. 88). Radioaktiv markierte Prozessierungsprodukte können folglich nur aus methylierter 45S RNA entstanden sein. Daher kann angenommen werden, daß die Prozessierung der 45S - pre rRNA in unbehandelten Kontrollzellen innerhalb 30 min -

RNA Spezies	ovalicinbeh.Zellen		Kontrollzellen	
	Gelstück- chen Nr.	Radioakt. der Bande [cpm]	Gelstück- chen Nr.	Radioakt. der Bande [cpm]
45S	23-32	17 700 cpm	25-34	24 800 cpm
41S			34-41	14 300 cpm
32S	41-47	6 280 cpm	41-47	11 400 cpm
28S	49-56	3 850 cpm	48-55	11 600 cpm
18S	64-70	3 240 cpm	64-70	6 140 cpm

Tab. 9: Eingebaute Radioaktivität in ribosomale RNA nach 30 min Markierung mit [methyl- ^3H]Methionin im Zellkern.

Je $2,2 \cdot 10^7$ Zellen in je 11,7 ml methioninfreiem Medium wurden mit und ohne Ovalicin 30 min mit je 2,5 mCi [methyl- ^3H]Methionin markiert. Ovalicinbehandelte Zellen waren 79% ihres Zellzyklus (in diesem Experiment 23 h) $2 \cdot 10^{-7}\text{M}$ Ovalicin ausgesetzt. Nach Gelelektrophorese wurde die Radioaktivität der einzelnen Banden bestimmt.

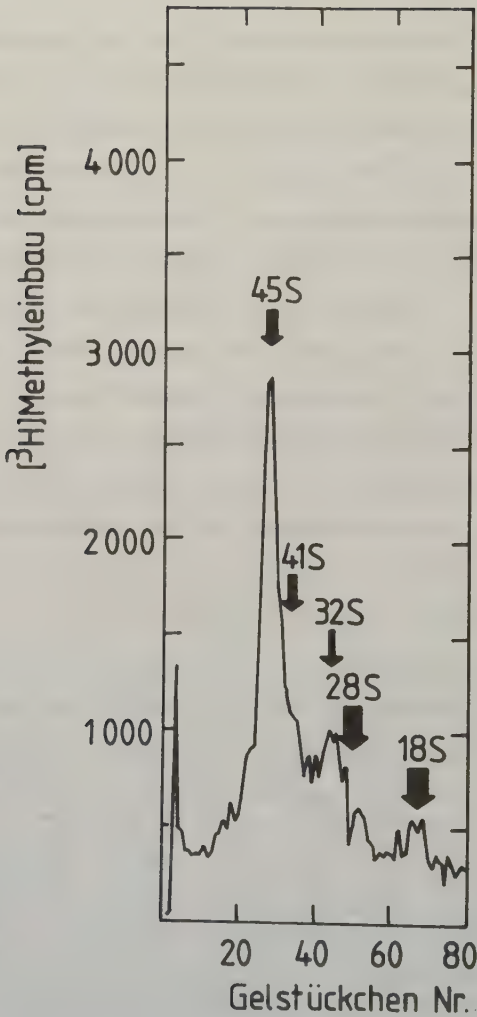


Fig. 7: Gelelektrophorese von KernRNA aus ovalicinbehandelten S49.1 Zellen nach 30 min Pulsmarkierung mit $[\text{methyl-}^3\text{H}]\text{Methionin}$.
 0,8% Agarose - 2,2M Formaldehydgel. Elektrophoresedauer 20 h bei $1,5 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$ und 4°C . $2,2 \cdot 10^7$ Zellen in 11,7 ml methionin-freiem Medium wurden 30 min mit 2,5 mCi $[\text{methyl-}^3\text{H}]\text{Methionin}$ inkubiert. Ovalicinbehandlung $2 \cdot 10^{-7}\text{M}$, 18 h (= 79 % des Zellzyklus, in diesem Experiment 23 h). Aufgetragen wurden 0,8l OD $[41 \mu\text{g}]$ = 50 % der isolierten KernRNA (67% der Kontrolle mit 1,2l OD, Fig. 8). Radioaktivitätsbestimmung mit Soluene 350 (S. 35-36), Szintillationszählung 5 min.

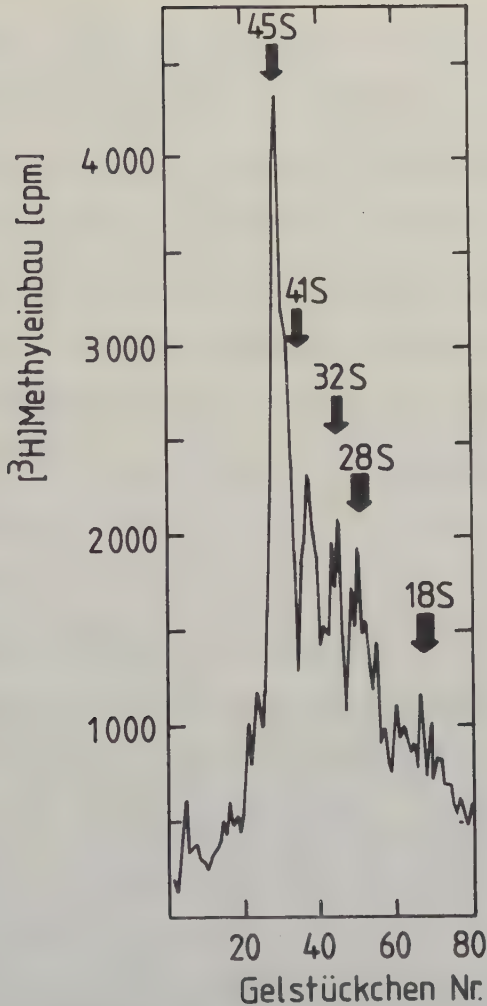


Fig. 8: Gelelektrophorese von KernRNA aus unbehandelten Kontrollzellen nach 30 min Pulsmarkierung mit [methyl- ^3H]Methionin.

0,8% Agarose - 2,2M Formaldehydgel. Elektrophoresedauer siehe Fig. 7. $2,2 \cdot 10^7$ Zellen in 11,7 ml methioninfreiem Medium wurden 30 min mit 2,5 mCi [methyl- ^3H]Methionin inkubiert. Aufgetragen wurden 1,21 OD [$61 \mu\text{g}$] = 50% der isolierten KernRNA. Radioaktivitätsbestimmung siehe Fig. 7.

wie bereits nach 20 min angedeutet (S. 63) - weiter fortgeschritten ist als in den drogenbehandelten Zellen.

Auf das Gel wurden 50% der isolierten KernRNA aufgetragen. Da aus ovalicinbehandelten Zellen auch in diesem Experiment weniger RNA isoliert wurde (67%, Tab. 2, S. 48, Versuchsbezeichnung "M30") als aus Kontrollzellen, wurde im Falle der drogenbehandelten Zellen auch weniger RNA auf das Gel aufgetragen. Um die Radioaktivität der einzelnen RNA Banden besser miteinander vergleichen zu können, wurden die gemessenen Werte (Tab. 9) jeweils durch die optische Dichte der auf das Gel aufgetragenen GesamtkernRNA (0,81 OD bzw. 1,21 OD) dividiert (Tab. 10).

RNA Spezies	ovalicinbeh.Zellen		Kontrollzellen	
	Gelstück- chen Nr.	Radioakt. der Bande [cpm/OD]	Gelstück- chen Nr.	Radioakt. der Bande [cpm/OD]
45S	23-32	21 700 cpm	25-34	20 400 cpm
41S			34-41	11 800 cpm
32S	41-47	7 710 cpm	41-47	9 370 cpm
28S	49-56	4 730 cpm	48-55	9 530 cpm
18S	64-70	3 980 cpm	64-70	5 060 cpm

Tab. 10: Eingebaute Radioaktivität in ribosomale RNA nach 30 min Markierung mit [methyl-³H]Methionin im Zellkern dividiert durch die optische Dichte der auf das Gel aufgetragenen GesamtkernRNA.
Division der Werte in Tab. 9 durch 0,81 OD (Ovalicin) bzw. 1,21 OD (Kontrolle).

Danach findet man in dem Primärtranskript mit und ohne Ovalicin annähernd gleiche Mengen an Radioaktivität. Das stützt die Annahme des vorangegangenen Experiments, daß die Methylierung des rRNA Vorläufers durch Ovalicin nicht gehemmt wird (S. 63). Das weitere Prozessieren des Moleküls wird durch Ovalicin jedoch gestört, die Prozessierungsprodukte sind in den Zellen, die der Droge ausgesetzt waren, um durchschnittlich 30% weniger radioaktiv markiert. Auffallend ist weiter das Fehlen - aufgrund des hohen Zählhintergrundes nicht nachweisbarer - markierter 41S RNA. Dieses Ergebnis kann mit der Hypothese erklärt werden, daß Ovalicin den ersten nukleolytischen Schnitt des Prozessierens von 45S pre rRNA zu 41S RNA - das Abtrennen des externen transkribierten Spacers (Fig. 1, S. 8) - verlangsamt (siehe Diskussion S. 133-136).

Analysiert man RNA aus dem Cytoplasma der Zellen auf die gleiche Weise, so findet man nach 30 min [^3H]Methioninmarkierung mit und ohne Ovalicin neben intensiv markierter RNA im Größsenbereich von tRNA (vermutlich hauptsächlich [^3H]met-tRNA_{met}) geringe Radioaktivität in 18S rRNA (ohne Beleg). 28S rRNA ist in beiden Fällen nicht markiert. Der Transport "reifer" - nach dem Prozessierungsschema (Fig. 1, S. 8) auch am schnellsten entstehenden - 18S rRNA in das Cytoplasma hat also bereits begonnen.

Inkubiert man S49.1 Zellen mit und ohne Ovalicin in methioninfreiem Medium 40 min mit je 2,5 mCi [methyl- ^3H]Methionin, findet man im Zellkern wieder eine ähnliche Verteilung der einge-

bauten Radioaktivität auf die einzelnen RNA Banden (Fig. 9 & 10). Ovalicin wirkte in diesem Experiment 76% des Zellzyklus (24 h) auf die Zellen ein. Die meiste Radioaktivität wird mit und ohne Ovalicin wiederum im 45S Primärtranskript gemessen. Sie ist jetzt allerdings in den Kontrollzellen deutlich größer als in den drogenbehandelten Zellen (Tab. 11). Wieder ist in diesen Zellen im Gegensatz zu Kontrollzellen keine radioaktiv markierte 41S RNA über dem Zählhintergrund zu erkennen (Fig. 9).

28S RNA ist in Kontrollzellen kaum nachweisbar markiert, im 28S Bereich ovalicinbehandelter Zellen wird eine breite Bande mit vier Gipfeln beobachtet. Es fällt auf, daß diesmal in RNA ovalicinbehandelter Zellen mehr eingebaute Radioaktivität gefunden wird als in der RNA der Kontrollzellen. Addiert man die Radioaktivität der einzelnen Gelstückchen der Gele, findet man 240 000 cpm Gesamtradioaktivität in der fraktionierten KernRNA ovalicinbehandelter Zellen gegenüber 204 000 cpm in der RNA der Kontrollzellen (Tab. 11). In 45S RNA ovalicinbehandelter Zellen wird 40% mehr Radioaktivität gefunden als in 45S RNA der Kontrollzellen. Zusätzlich wurde weniger RNA aus den drogenbehandelten Zellen isoliert (in diesem Experiment 96%, siehe Tab. 2, S. 48, Versuchsbezeichnung "M40"). Damit erhöht sich die spezifische Radioaktivität der 45S RNA gegenüber den Kontrollzellen noch weiter.

Am einfachsten läßt sich dieser seltsame Effekt mit einem durch die Aufarbeitung verursachten Verlust von RNA aus Kontrollzellen erklären.

RNA Spezies	ovalicinbeh.Zellen		Kontrollzellen	
	Gelstück- chen Nr.	Radioakt. der Bande [cpm]	Gelstück- chen Nr.	Radioakt. der Bande [cpm]
45S	44-59	77 500 cpm	44-59	55 500 cpm
41S			60-69	22 600 cpm
32S	77-84	22 300 cpm	76-83	20 800 cpm
18S	113-123	21 100 cpm	111-121	15 900 cpm
Σ	1-138	240 000 cpm	1-138	204 000 cpm

Tab. 11: Eingebaute Radioaktivität in ribosomale RNA nach 40 min Markierung mit [methyl-³H]Methionin im Zellkern.

Je $2,3 \cdot 10^7$ Zellen in je 11,7 ml methioninfreiem Medium wurden mit und ohne Ovalicin 40 min mit je 2,5 mCi [methyl-³H]Methionin markiert. Ovalicinbehandelte Zellen waren 76% ihres Zellzyklus (in diesem Experiment 24 h) $2 \cdot 10^{-7}$ M Ovalicin ausgesetzt.

In ovalicinbehandelten S49.1 Zellen findet man im 45S Primärtranskript 32% der Gesamtradioaktivität, die auf dem Gel der fraktionierten KernRNA festzustellen ist (77 500 cpm von 240 000 cpm), in 45S pre rRNA der Kontrollzellen dagegen 27% (55 500 cpm von 204 000 cpm). 45S RNA ist in ovalicinbehandelten Zellen 3,5 mal stärker markiert als die aus ihr hervorgegangene 32S RNA, in Kontrollzellen nur 2,7 mal. 45S RNA ist in ovalicinbehandelten Zellen 3,7 mal stärker markiert als die aus ihr hervorgegangene 18S RNA, in Kontrollzellen 3,5 mal. [³H]markierte 18S RNA wird jedoch bereits aus dem Zellkern in das Cytoplasma transportiert. Diese Aussagen sind unabhängig von dem vermutlich experimentell begründeten Effekt (S. 70)!

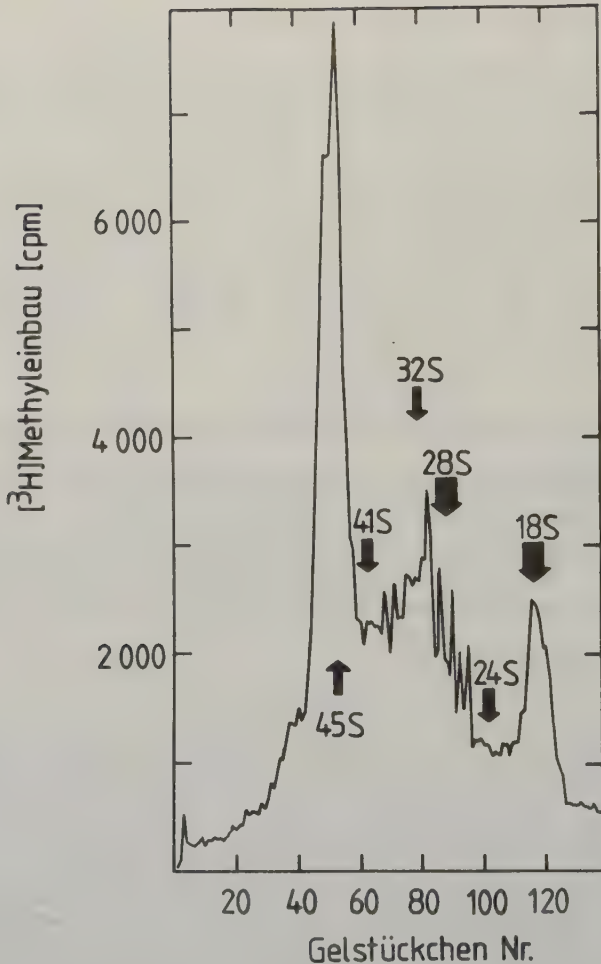


Fig. 9: Gelelektrophorese von KernRNA aus ovalicinbehandelten S49.1 Zellen nach 40 min Pulsmarkierung mit $[\text{methyl-}^3\text{H}]\text{Methionin}$.

0,8% Agarose - 2,2M Formaldehydgel. Elektrophoresedauer 22 h bei $1,75 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$ und 4°C . $2,3 \cdot 10^7$ Zellen in 11,7 ml methionin-freiem Medium wurden 40 min mit 2,5 mCi $[\text{methyl-}^3\text{H}]\text{Methionin}$ inkubiert. Ovalicinbehandlung $2 \cdot 10^{-7}\text{M}$, 18 h (= 76 % des Zellzyklus, in diesem Experiment 24 h). Aufgetragen wurden 1,23 OD $[61 \mu\text{g}]$ = 40 % der isolierten KernRNA (96% der Kontrolle mit 1,28 OD, Fig. 10). Radioaktivitätsbestimmung mit Soluene 350 (S. 35-36), Szintillationszählung 5 min.

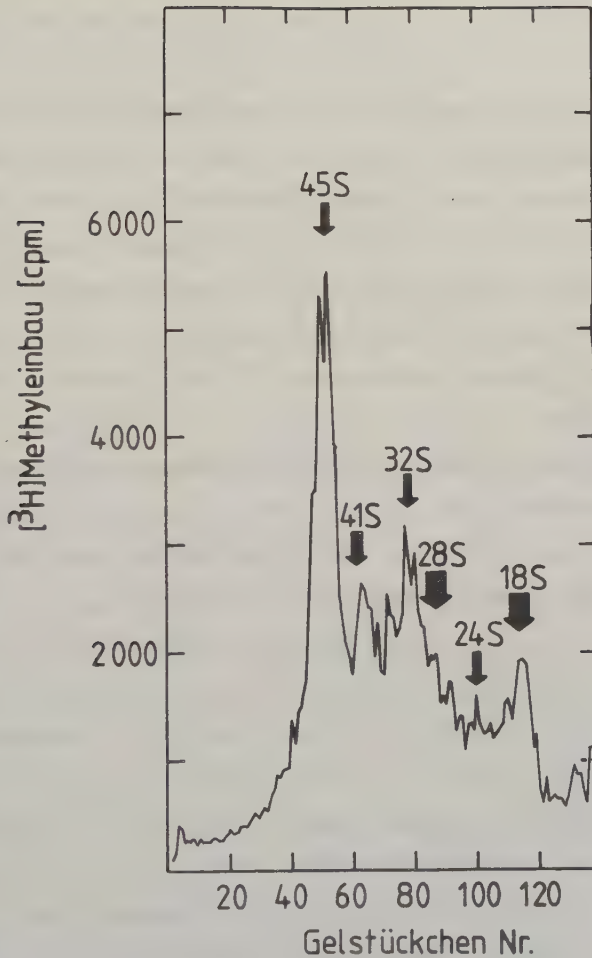


Fig. 10: Gelelektrophorese von KernRNA aus unbehandelten Kontrollzellen nach 40 min Pulsmarkierung mit $[\text{methyl-}^3\text{H}]\text{Methionin}$.

0,8% Agarose - 2,2M Formaldehydgel. Elektrophoresedauer siehe Fig. 9. $2,3 \cdot 10^7$ Zellen in 11,7 ml methioninfreiem Medium wurden 40 min mit 2,5 mCi $[\text{methyl-}^3\text{H}]\text{Methionin}$ inkubiert. Aufgetragen wurden 1,28 OD $[64 \mu\text{g}] = 40\%$ der isolierten KernRNA. Radioaktivitätsbestimmung siehe Fig. 9.

45S RNA scheint sich also im Verhältnis zu seinen Prozessierungsprodukten in ovalicinbehandelten Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen etwas anzuheufen. Da auch nach 40 min Pulsmarkierung mit [methyl- ^3H]Methionin in Gegenwart von Ovalicin keine signifikanten Mengen [^3H]methylmarkierter 41S RNA gefunden werden, stützen damit zwei Experimente (Fig. 7 & 8, S. 66 & 67; Fig. 9 & 10, S. 72 & 73) die Hypothese, daß Ovalicin den ersten Schritt des Prozessierens von 45S- in 41S RNA (Fig. 1 & 2, S. 8 & 10) verlangsamt.

Im Cytoplasma der Zellen findet man nach 40 min Markierung mit [methyl- ^3H]Methionin mit und ohne Ovalicin neben stark markierter tRNA nur radioaktiv markierte 18S rRNA. 28S rRNA ist in beiden Fällen noch nicht markiert (ohne Beleg).

Kleine RNAs

Es ist schon seit längerem bekannt, daß kleine RNAs (ca. 80 - 400 Nukleotide) im Zellkern (small nuclear RNAs, snRNAs) am Prozessieren von rRNA und hnRNA ("mRNA splicing") beteiligt sind (Busch *et al.*, 1982). So wurden neben 5,8S RNA (Pene *et al.*, 1968; Nazar, 1980; Jacq, 1981; früher "7S-" oder "5,5S - RNA" genannt, siehe dazu Weinberg & Penman, 1968), U3 RNA, 8S RNA (Prestayko *et al.*, 1970; Zieve & Penman, 1976; Reddy *et al.*, 1983) und 7-1 RNA (Reddy *et al.*, 1981), stabil über Wasserstoffbrücken an 28S RNA gebunden, im Nucleolus gefunden (U3 an 28S- und 32S RNA).

Es wird angenommen, daß diese RNAs in Form von snRNPs (small nuclear ribonucleoprotein particles; Lerner & Steitz, 1979), mit Proteinen assoziiert, an spezifischen Schneide- und Ligasefunktionen beteiligt sind (Busch *et al.*, 1982).

Daher wurde in der vorliegenden Arbeit auch untersucht, ob die Wirkung von Ovalicin auf der Hemmung der Synthese einer oder mehrerer dieser kleinen RNAs beruhen könnte, die für das Prozessieren ribosomaler RNA essentiell sind.

(Übersichtsartikel: Busch *et al.*, 1982; Reddy & Busch, 1983)

S49.1 Zellen wurden mit und ohne Ovalicin 30, 60 und 90 min mit [³H]Uridin markiert und ein Teil der isolierten KernRNA auf 5 - 10% Acrylamid - Harnstoffgelen aufgetrennt. Die Gele wurden mit einem Szintillator (Amplify) behandelt, getrocknet und durch Fluorographie (S. 42-43) analysiert.

Markiert man S49.1 Zellen mit und ohne Ovalicin 30 min mit [^3H]Uridin und trennt die RNA aus den Zellkernen auf einem 5% Acrylamid - 8M Harnstoffgel auf, findet man in der Fluorographie des Geles mit und ohne Ovalicin neben nicht aufgetrennten höhermolekularen RNAs (ab ca. 300 Nukleotiden) je sieben radioaktiv markierte RNA Banden, die jedoch in ovalicinbehandelten Zellen schwächer markiert sind als in unbehandelten Kontrollzellen (ohne Beleg). Je drei schwach markierte Banden mit Kettenlängen von 200 - 300 Nukleotiden konnten dabei nicht zugeordnet werden, da bei der Durchführung des Experimentes außer 5S rRNA und tRNA aus *E. coli* keine weiteren Längenstandards zur Verfügung standen. Je drei stark markierte Banden im unteren Bereich des Geles ließen sich 5,8S rRNA (158 Nukleotide, Tab. 12), 5S rRNA (121 Nukleotide) und tRNA (mit einer elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit, die 84 - 88 ¹⁾ Nukleotiden entspricht) zuordnen. Mit und ohne Ovalicin am stärksten markiert war eine Bande mit einer Kettenlänge von ca. 100 Nukleotiden. Diese Bande war auch in einer RNA Präparation radioaktiv markiert, die aus dem Cytoplasma isoliert wurde, jedoch dort wesentlich geringer als tRNA (ohne Beleg). Prestayko *et al.* (1970) zitieren jedoch mehrere Autoren, die eine RNA Spezies beobachtet haben, die in Polyacrylamidgelen zwischen 5S- und 4S RNA (=tRNA) wandert und zudem schnell durch radioaktive Vorläufermoleküle markiert wird. In Übereinstimmung mit Ro-Choi *et al.* (1970) und Reddy *et al.* (1981) wurde sie als 4,5S RNA bezeichnet.

¹⁾ tRNAs aus Mäusen sind 75-76 Nukleotide lang (aus zwölf bisher bekannten Sequenzen)

Markiert man S49.1 Zellen mit und ohne Ovalicin 60 min mit [^3H]Uridin und analysiert die RNA aus den Zellkernen auf einem 10% Acrylamid - 8M Harnstoffgel, findet man in der Fluorographie des Geles mit und ohne Ovalicin neben höhermolekularer RNA (>300 Nukleotide) je dreizehn radioaktiv markierte Banden, die in Abb. 2 und Fig. 11 nach absteigender Kettenlänge mit 1 - 13 numeriert wurden. Wieder wurden in ovalicinbehandelten Zellen alle RNA Banden weniger radioaktiv markiert als in den Kontrollzellen. Als Längenstandards standen diesmal neben 5S rRNA aus *E. coli* die URNAs 1 - 6 (ohne U3) aus Ehrlich Ascites Tumorzellen der Maus zur Verfügung. Die Kettenlängen dieser und einiger anderer, im Rahmen dieser Arbeit interessanter snRNAs sind kurz in Tab. 12 zusammengefaßt.

snRNA	Kettenlänge [Nukleotide]	alternative Nomenklatur
U1	165	D
U2	188-189	C
U3	210-214*)	A, D2
U4	142-146	F
U5	116-118	G', 5S III
U6	107-108	H1, 4,5 III
5S	121	G
5,8S	158	E
La 4,5 I	98-99	H2
7S	294-295	L
7-1	ca. 260	M
8S	273-274**)	

Tab. 12: Kettenlängen einiger snRNAs.
 Verkürzte Tabelle aus Busch *et al.* (1982).
 *) 216 Nukleotide nach Bachellerie *et al.* (1983)
 **) nach Reddy *et al.* (1983)

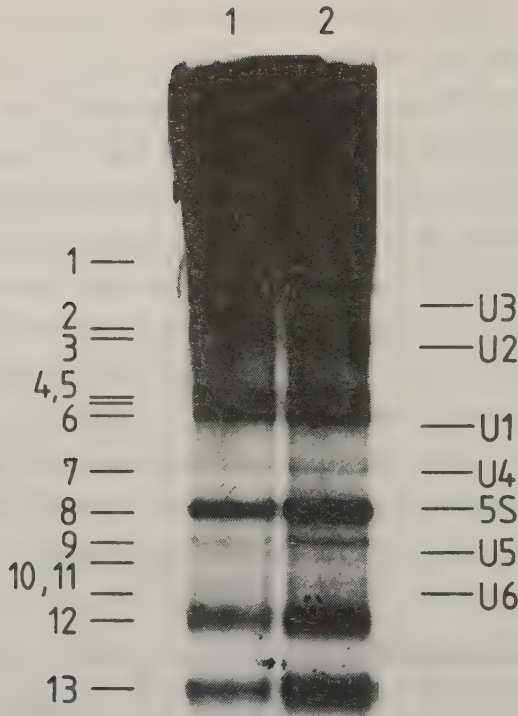


Abb. 2: Fluorographie der Gelelektrophorese von kleiner KernRNA aus S49.1 Zellen nach 60 min Pulsmarkierung mit [^3H]Uridin.

10% Acrylamid-8M Harnstoffgel. Elektrophoresedauer 20 h, 100 V ($7 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$), Raumtemperatur. Je $1,45 \cdot 10^7$ Zellen wurden in je 11,6 ml Kulturmedium 60 min mit je 250 μCi [^3H]Uridin markiert.

Spur 1: KernRNA aus ovalicinbehandelten Zellen.

Ovalicinbehandlung $2 \cdot 10^{-7} \text{M}$, 18 h = 93% eines Zellzyklus (in diesem Experiment 20 h). Aufgetragen wurden 1,09 OD [54 μg] = 25% der isolierten KernRNA.

Spur 2: KernRNA aus unbehandelten Kontrollzellen. Aufgetragen wurden 1,24 OD [62 μg] = 25% der isolierten KernRNA.

KODAK XAR-5, 4 Tage exponiert (-70°C), nicht vorbelichtet. Längenstandards: 5S rRNA aus *E. coli* und URNAs 1-6 (ohne U3) aus Ehrlich Ascites Tumorzellen der Maus (Kettenlängen siehe Tab. 12) wurden neben S49.1 KernRNA aufgesetzt, getrennt sichtbar gemacht (siehe S. 43) und rechnerisch den Banden der Fluorographie zugeordnet. Position von U3 RNA errechnet.

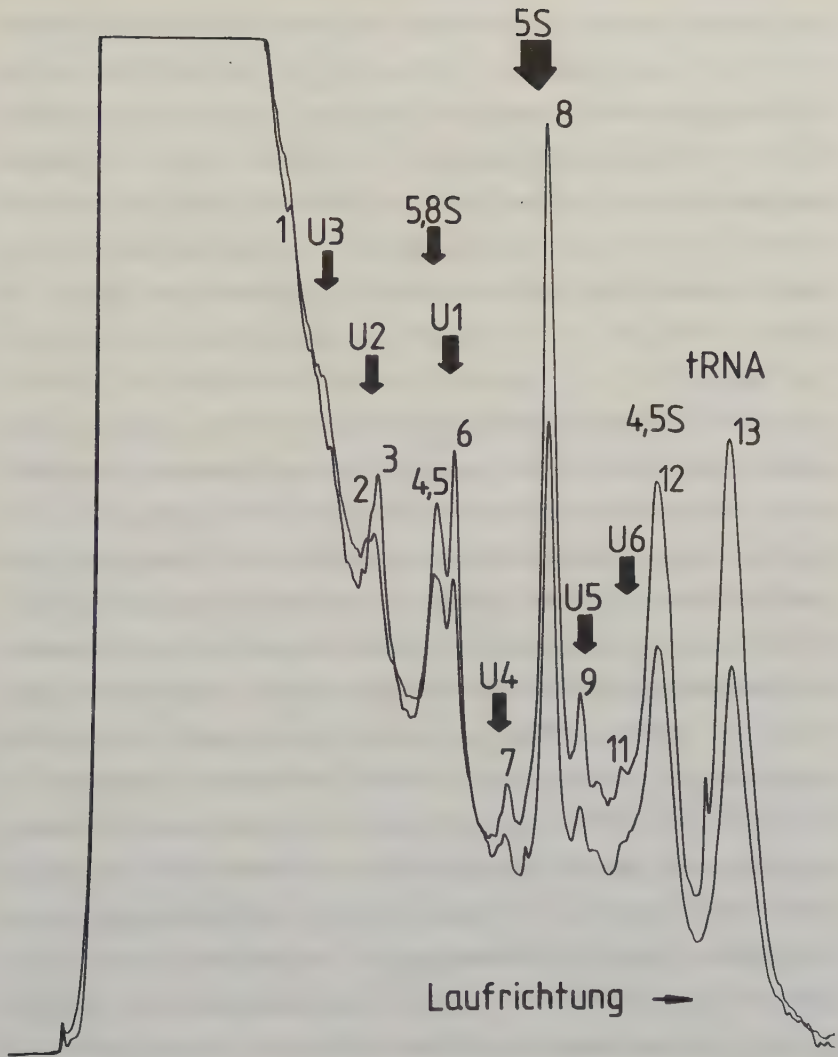


Fig. 11: Densitometrische Auswertung der Fluorographie der Gelelektrophorese von kleiner KernRNA aus S49.1-Zellen nach 60 min Pulsmarkierung mit $[^3\text{H}]$ Uridin. Obere Kurve: KernRNA aus unbehandelten Kontrollzellen. Untere Kurve: KernRNA aus ovalicinbehandelten Zellen (siehe Abb. 2). Position von U3 RNA errechnet, Position von 5,8S RNA und tRNA aus cytoplasmatischer RNA. Die Zahlenangaben beziehen sich auf die Numerierung der Banden in Abb. 2.

Die längste in Abb. 2 erkennbare definierte RNA Spezies (Bande Nr. 1) ist wahrscheinlich 7S RNA (294-295 Nukleotide), da man diese Bande auch in RNA, die aus dem Cytoplasma der Zellen isoliert wurde, radioaktiv markiert findet (ohne Beleg) und von Reddy *et al.* (1981) auch erstmals 30 - 50% der gesamten 7S RNA im Zellkern gefunden wurde. Als ein Bestandteil der signal recognition particle (SRP) im Cytoplasma (Walter & Blobel, 1982) ist ihr Vorkommen im Cytoplasma auch zu erwarten. Bande Nr. 2 & 3 wandern eng nebeneinander auf gleicher Höhe wie U2 RNA (188-189 Nukleotide). Bande Nr. 4 & 5 laufen, gerade noch voneinander getrennt, etwas langsamer als Bande Nr. 6, die wiederum mit U1 RNA (165 Nukleotide) auf einer Höhe wandert. Bande Nr. 4 & 5 können 5,8S RNA (158 Nukleotide) zugeordnet werden, da sie in RNA aus dem Cytoplasma der Zellen - ebenfalls als Doppelbande ²⁾ - auf gleicher Höhe radioaktiv markiert gefunden wird (ohne Beleg). U1 RNA wandert mit einer Länge von 165 Nukleotiden in einem 10% Acrylamid - Harnstoffgel schneller als 5,8S RNA mit 158 Nukleotiden, wie Reddy *et al.* (1981) und Walter & Blobel (1982) dokumentierten ³⁾. Bande Nr. 6 könnte demnach mit der häufig vorkommenden U1 RNA identisch sein. Bande Nr. 7 ist nur schwach markiert und wandert mit U4 RNA (142-146 Nukleotide) auf einer Höhe. Bande Nr. 8 ist mit und ohne Ovalicin am stärksten markiert und läßt sich 5S RNA (121 Nukleotide) zuordnen. Bande Nr. 9 ist wiederum

²⁾ Walker & Pace (1983) beschrieben zwei Populationen von 5,8S RNA
Bowman *et al.* (1983) beschrieben zwei cytoplasmatische 5,8S rRNAs mit heterogenen 5'Enden

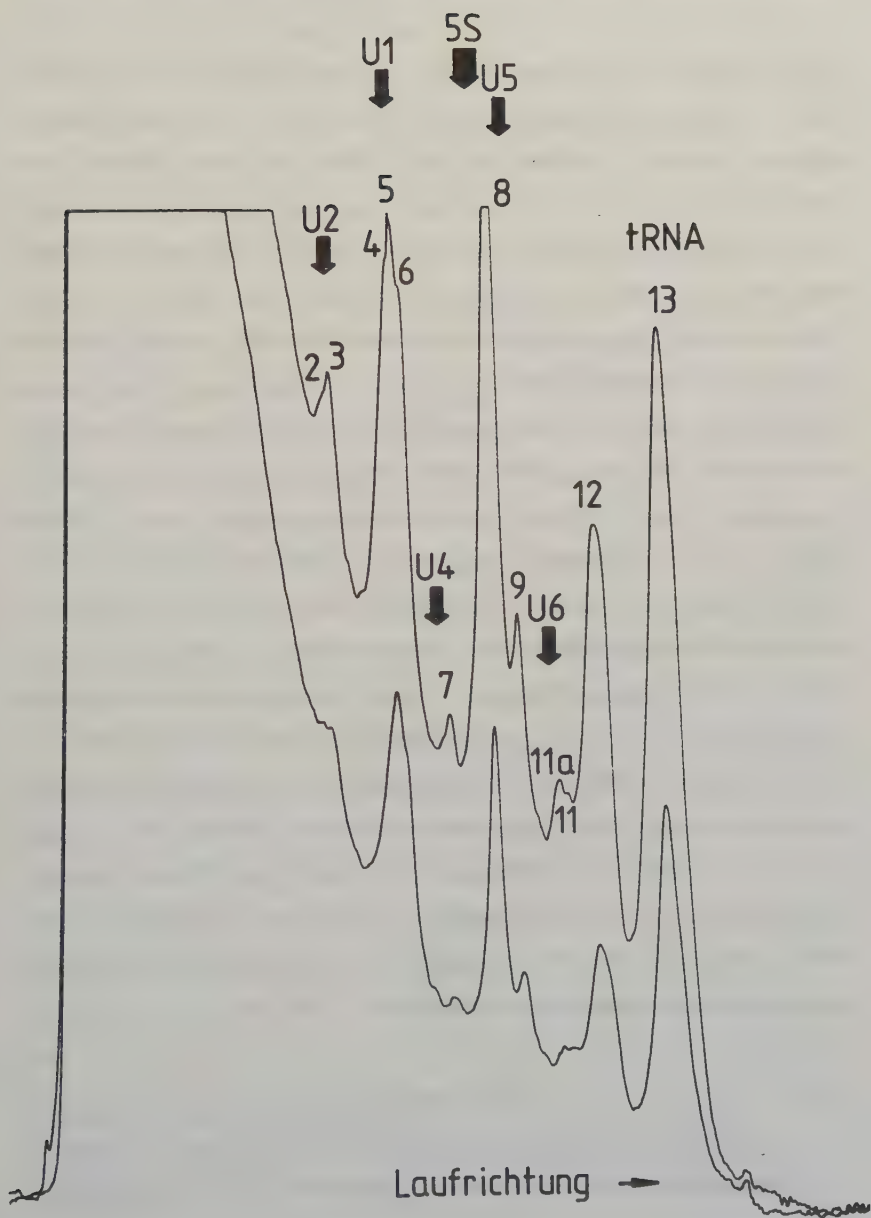
³⁾ Reddy *et al.* (1983) beschreiben das abnormale Wanderungsverhalten von 5,8S RNA in Abhängigkeit von der Polyacrylamidkonzentration genauer

schwach markiert und wandert mit U5 RNA (116-118 Nukleotide) auf einer Höhe. Die Banden Nr. 10 & 11 sind auf der Fluorographie gerade noch zu erkennen und wandern etwas langsamer als U6 RNA (107-108 Nukleotide). Bande Nr. 12 ist etwa so stark markiert wie Bande Nr. 13 (tRNA), entspricht einer Kettenlänge von ca. 100 Nukleotiden und ist wahrscheinlich mit 4,5S RNA identisch, die nach 30 min Markierung mit [^3H]Uridin am stärksten markiert wurde (s.o.).

Markiert man S49.1 Zellen mit und ohne Ovalicin 90 min mit [^3H]Uridin, findet man - verglichen mit der 60 min Markierung - im wesentlichen die gleichen RNA Banden im Zellkern radioaktiv markiert. Fig. 12 zeigt die densitometrische Auswertung der Fluorographie dieses Experiments. Wieder sind alle RNA - Spezies, die aus ovalicinbehandelten Zellen isoliert wurden (untere Kurve), weniger markiert als in den Kontrollzellen. Bande Nr. 3 ist diesmal stärker markiert als Bande Nr. 2, die in der densitometrischen Auswertung nur noch als kleine Schulter zu erkennen ist. Die Banden Nr. 4, 5 und 6 wurden schlechter voneinander getrennt und erscheinen im Fall der Kontrollzellen (Fig. 12, obere Kurve) als ein Gipfel mit zwei Schultern. Zwischen Bande Nr. 9 und 12 findet man wieder zwei schwach radioaktiv markierte Banden. Eine (Bande Nr. 11) dürfte mit Bande Nr. 11 des vorangegangenen Experimentes (Fig. 11) identisch sein, die zweite erkennbare Bande lief jedoch zwischen Bande Nr. 11 und 12 und wurde daher als Bande Nr. 11a bezeichnet.

Zusammenfassend läßt sich sagen: alle RNA Spezies, die in unbehandelten Kontrollzellen radioaktiv markiert wurden, wurden auch in RNA aus ovalicinbehandelten Zellen markiert, jedoch immer mit geringeren Einbauraten. U3 RNA, notwendig für das Prozessieren ribosomaler RNA (Bachelier *et al.*, 1983; Sommerville, 1985), ist in keinem Experiment radioaktiv markiert gefunden worden. Sie müßte mit einer Kettenlänge von 210 - 214 Nukleotiden in der Gelelektrophorese etwas langsamer als U2 RNA (188-189 Nukleotide) wandern (Abb. 2; Fig. 11 oder 12; siehe auch Reddy *et al.*, 1981). Ob snRNAs überhaupt radioaktiv markiert wurden, blieb unbewiesen, denn selbstverständlich ist das gleiche Wanderungsverhalten von Bande Nr. 2 oder 3 mit U2 RNA, von Bande Nr. 6 mit U1 RNA, von Bande Nr. 7 mit U4 RNA und von Bande Nr. 9 mit U5 RNA kein Beweis für deren Identität. Da UsnRNAs mit Halbwertszeiten bis zu einem Zellzyklus (Weinberg & Penman, 1968; Busch *et al.*, 1982) auch sehr stabil

Fig. 12: Densitometrische Auswertung einer Fluorographie der Gelelektrophorese von kleiner KernRNA aus S49.1-Zellen nach 90 min Pulsmarkierung mit [3 H]Uridin.
 10% Acrylamid-8M Harnstoffgel. Elektrophoresedauer 15 h, 120 V ($8,5 \text{ V}\cdot\text{cm}^{-1}$), Raumtemperatur. $1,4\cdot 10^7$ Zellen (Ovalicin) bzw. $1,5\cdot 10^7$ Zellen wurden in je 11,6 ml Kulturmedium 90 min mit je 250 μCi [3 H]Uridin markiert.
Untere Kurve: KernRNA aus ovalicinbehandelten Zellen. Ovalicinbehandlung $2\cdot 10^{-7}\text{M}$, 18 h = 95% eines Zellzyklus (in diesem Experiment 19 h). Aufgetragen wurden 1,10 OD [$55 \mu\text{g}$] = 25% der isolierten KernRNA.
Obere Kurve: KernRNA aus unbehandelten Kontrollzellen. Aufgetragen wurden 1,45 OD [$72 \mu\text{g}$] = 25% der isolierten KernRNA.
 KODAK XAR-5, 4 Tage exponiert (-70°C), nicht vorbelichtet. Längenstandards siehe Abb. 2 und Fig. 11. Bande Nr. 1 außerhalb des Meßbereiches.



sind, ist eine hohe Syntheserate auch nicht unbedingt zu erwarten.

Eine 8S RNA, die Prestayko *et al.* (1970) basengepaart an 28S - RNA im Nucleolus fanden, konnte in diesen Experimenten nicht gefunden werden. 8S RNA ist 273 oder 274 Nukleotide lang (Reddy *et al.*, 1983). Sie wandert jedoch in 10% Acrylamid - Harnstoffgelen abnormal langsam und verhält sich wie eine RNA, die 400 Basen lang ist (Busch *et al.*, 1982; Reddy *et al.*, 1983). Durch diese Besonderheit würde 8S RNA in den hier beschriebenen Experimenten bereits in einem Bereich des Geles wandern, in dem sie ein hoher radioaktiver Hintergrund höhermolekularer RNAs (hauptsächlich hnRNAs) verdeckt. 8S RNA wurde inzwischen als stabiles Prozessierungsprodukt von 12S RNA (Fig. 1, S. 8) erkannt (Reddy *et al.*, 1983; Hadjiolova *et al.*, 1984b). Die von Reddy *et al.* (1981) beschriebene 7-1 RNA (ca. 260 Nukleotide) konnte nicht identifiziert werden, da - mit Restriktionsfragmenten viraler DNA - festgestellt wurde, daß Logarithmus der relativen Molmasse und Wanderungstrecke in diesem Bereich des Geles nicht mehr direkt proportional verlaufen und die einzige radioaktiv markierte Bande, die langsamer als U2 RNA (188-189 Nukleotide) wanderte, 7S RNA zugeordnet wurde (s.o.). 7-1 RNA scheint zudem noch stabiler als U3 - RNA zu sein (Reddy *et al.*, 1981) und eine radioaktive Markierung wäre noch weniger zu erwarten.

Alle RNA Spezies, die in unbehandelten Kontrollzellen radioaktiv markiert, d. h. synthetisiert wurden, sind auch in ovalinbehandelten Zellen zu finden, jedoch mit geringeren Einbau-

raten. Dies war nicht unbedingt zu erwarten. Der Einfluß von Ovalicin auf die Prozessierung des 45S RNA Vorläufers im Zellkern (siehe Kap. Prozessieren ribosomaler RNA) erklärt streng genommen nur die verminderte Syntheserate einer einzigen Bande, nämlich 5,8S RNA (Bande Nr. 4 & 5; Abb. 2, Fig. 11 & 12) als Bestandteil der ribosomalen Transkriptionseinheit. Daß die Synthese von 5S RNA (Bande Nr. 8) ebenfalls reduziert ist, läßt sich auch verstehen, da man davon ausgehen kann, daß die Synthese dieser rRNA, die außerhalb der ribosomalen Transkriptionseinheit transkribiert wird, in irgendeiner Weise mit der Synthese der anderen rRNAs gekoppelt sein muß. 5S RNA wird bereits in frühen Stadien der Preribosomenreifung - als 11S RNP (Auger *et al.*, 1974) - im Nucleolus an RNA-Protein Komplexe - "primäre Preribosomen" - angelagert (Hadjiolov, 1985, S. 103, S. 134; Sommerville, 1985), jedoch scheint die Transkription der 5S rRNA Gene - zumindest in *Drosophila* oder *Xenopus* - unabhängig von der Transkription der Transkriptionseinheit zu sein (Hadjiolov, 1985, S. 152).

5S RNA wird jedoch wie tRNA von der eukaryotischen RNA Polymerase III transkribiert, während das 45S RNA Molekül, aus dem schließlich 28S-, 18S- und 5,8S rRNA hervorgehen, von der RNA Polymerase I transkribiert wird. Damit ist die reduzierte Synthese von tRNA - die nach Zimmermann und Hartmann (1981) jedoch weniger als die rRNA Synthese gehemmt wird - nicht so ohne weiteres zu verstehen ⁴⁾. Zwar wurde aus ovalicinbehandel-

⁴⁾ Quantitative Aussagen aufgrund der densitometrischen Auswertung wurden unterlassen, da die Schwärzung des Filmes innerhalb der Banden zu ungleichmäßig verteilt war, um geringe Intensitätsunterschiede überzeugend zu belegen

ten Zellen weniger GesamtrNA - damit bei gleicher spezifischer Radioaktivität auch weniger Radioaktivität - aus den Zellkernen isoliert und damit auf das Gel aufgesetzt. Bei gleicher Syntheserate von tRNA mit und ohne Ovalicin sollte jedoch die gleiche Menge tRNA in dieser GesamtkernRNA enthalten und zudem gleich markiert worden sein.

Gleiches könnte für Transkripte der RNA Polymerase II gelten, die neben den hnRNA Genen auch die Gene der (ebenfalls "gecappten") URNAs transkribiert (Gram Jensen *et al.*, 1979; Busch *et al.*, 1982). Jedenfalls wurden keine RNA Spezies gefunden, die mit und ohne Ovalicin gleich stark markiert, d. h. mit der gleichen Geschwindigkeit synthetisiert wurden. Gestützt wird diese Vermutung durch die Analyse von KernRNA, die mit und ohne Ovalicin 60 min mit [^3H]Uridin markiert wurde (Fig. 27 & 28; S. 119 - 122).

Ein direkter Einfluß von Ovalicin auf die Syntheseleistung der RNA Polymerasen wurde jedoch durch *in vitro* Experimente mit isolierten Zellkernen aus Lymphocyten ausgeschlossen (Zimmermann & Hartmann, 1981) und kann darüber hinaus nicht die beobachtete Änderung des Prozessierungsschemas ribosomaler RNA erklären.

Ein direkter Einfluß von Ovalicin auf die Synthese kleiner RNAs konnte damit in den durchgeführten Experimenten nicht nachgewiesen werden.

Transport ribosomaler RNA in das Cytoplasma

In der Erwartung, längere Markierungszeiten mit [methyl- ^3H]-Methionin würden weitere Hinweise auf eine Störung des Prozessierens ribosomaler RNA durch Ovalicin erbringen, wurden S49.1 Zellen in methioninfreiem Medium mit und ohne Ovalicin (57% des Zellzyklus von 31 h) 60 min mit je 2,5 mCi [methyl- ^3H]Methionin markiert. Auch in diesem Experiment wurde 45S RNA in der fraktionierten RNA der Zellkerne mit und ohne Ovalicin am stärksten radioaktiv markiert, mit 63 200 cpm (Gelstückchen Nr. 38-51) im Fall der ovalicinbehandelten Zellen und 71 900 cpm (Gelstückchen Nr. 41-54) im Fall der Kontrollzellen (Fig. 13 & 14; Tab. 13). Aus den Zellkernen ovalicinbehandelter Zellen wurde in diesem Experiment RNA mit 95% der optischen Dichte gegenüber den Kontrollzellen isoliert (Tab. 2, S. 48, Versuchsbezeichnung "M60"). Damit ist - nach dieser Korrektur - der 45S rRNA Vorläufer in diesem Experiment in ovalicinbehandelten Zellen gegenüber der Kontrolle etwas weniger (um 8%) radioaktiv markiert worden als in den Versuchen mit kürzeren Markierungszeiten. Dies könnte - abgesehen von experimentell bedingten Schwankungen - darauf zurückzuführen sein, daß der Vorrat an [^3H]markiertem S-Adenosylmethionin nach längeren Inkubationszeiten langsam zur Neige geht und sich die etwas geringere Aufnahme von Methionin durch die drogenbehandelten Zellen bemerkbar macht (Tab. 8, S. 58).

In der KernRNA ovalicinbehandelter Zellen (Fig. 13) findet man

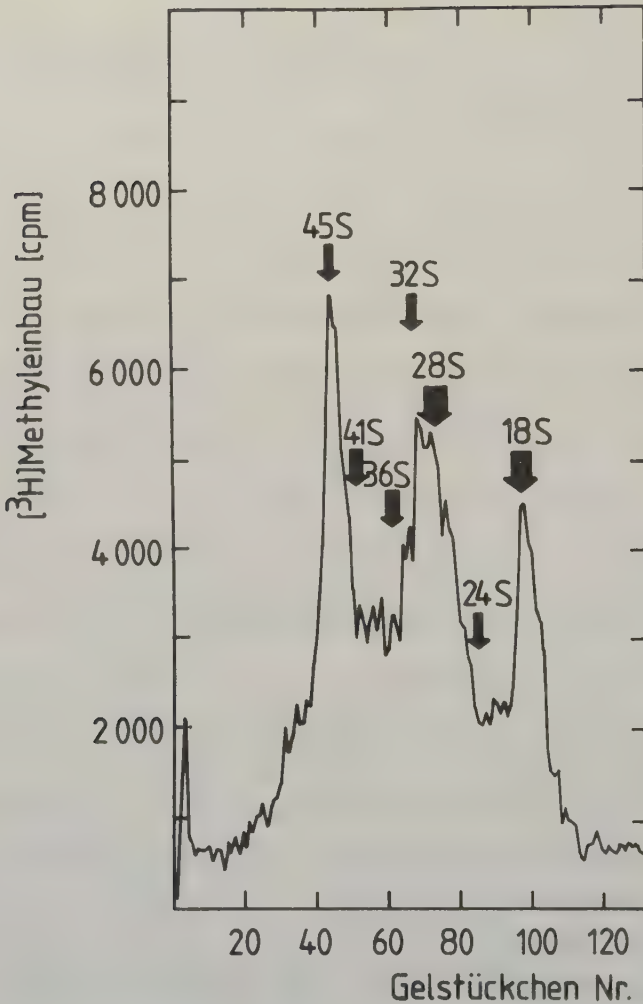


Fig. 13: Gelelektrophorese von KernRNA aus ovalicinbehandelten S49.1-Zellen nach 60 min Pulsmarkierung mit $[\text{methyl-}^3\text{H}]\text{Methionin}$.

0,8% Agarose-2,2M Formaldehydgel. Elektrophoresedauer 18 h bei $1,75 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$ und 4°C . $2,3 \cdot 10^7$ Zellen in 11,7 ml methioninfreiem Medium wurden 60 min mit $2,5 \text{ mCi } [\text{methyl-}^3\text{H}]\text{Methionin}$ inkubiert. Ovalicinbehandlung $2 \cdot 10^{-7} \text{ M}$, 18 h (= 57 % des Zellzyklus, in diesem Experiment 31 h). Aufgetragen wurden 1,58 OD $[79 \mu\text{g}]$ = 40 % der isolierten KernRNA (95% der Kontrolle mit 1,66 OD, Fig. 14). Radioaktivitätsbestimmung mit NaOH / SDS, Szintillationszählung 5 min.

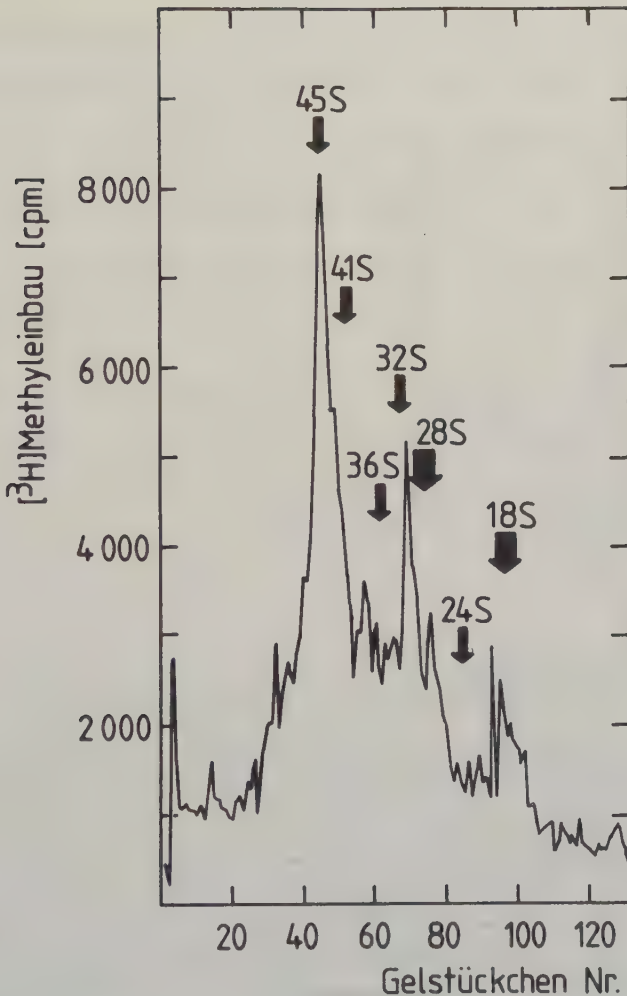


Fig. 14: Gelelektrophorese von KernRNA aus unbehandelten Kontrollzellen nach 60 min Pulsmarkierung mit [methyl- ^3H]Methionin.

0,8% Agarose - 2,2M Formaldehydgel. Elektrophoresedauer siehe Fig. 13. $2,3 \cdot 10^7$ Zellen in 11,7 ml methioninfreiem Medium wurden 60 min mit 2,5 mCi [methyl- ^3H]Methionin inkubiert. Aufgetragen wurden 1,66 OD [83 μg] = 40% der isolierten KernRNA. Radioaktivitätsbestimmung siehe Fig. 13.

in dem Bereich, in dem 32S- und 28S RNA wandern (Gelstückchen Nr. 67-80), einen breiten radioaktiven "Berg", der etwas mehr Radioaktivität enthält als das 45S RNA Molekül (64 200 cpm) und radioaktiv markierte 18S RNA (Gelstückchen Nr. 93-104, 38 800 cpm). In der KernRNA der Kontrollzellen (Fig. 14) findet sich neben einem radioaktiven Gipfel im 18S Bereich (Gelstückchen Nr. 92-103, 21 800 cpm) und dem 45S Primärtranskript ein weiterer Gipfel im 32 - 28S Bereich. In diesem Bereich werden 42 100 cpm gefunden, also nur zwei Drittel der Radioaktivität im entsprechenden Bereich des Geles, in dem KernRNA aus ovalicinbehandelten Zellen aufgetrennt wurde. Tab. 13 faßt die Daten dieses Versuches zusammen.

RNA Spezies	ovalicinbeh.Zellen		Kontrollzellen	
	Gelstück- chen Nr.	Radioakt. der Bande [cpm]	Gelstück- chen Nr.	Radioakt. der Bande [cpm]
45S	38-51	63 200 cpm	41-54	71 900 cpm
32-28S	67-80	64 200 cpm	67-80	42 100 cpm
18S	93-104	38 800 cpm	92-103	21 800 cpm
Σ	1-132	307 000 cpm	1-131	270 000 cpm

Tab. 13: Eingebaute Radioaktivität in ribosomale RNA des Zellkerns nach 60 min Markierung mit [methyl- ^3H]Methionin.

Je $2,3 \cdot 10^7$ Zellen in je 11,7 ml methioninfreiem Medium wurden mit und ohne Ovalicin 60 min mit je 2,5 mCi [methyl- ^3H]Methionin markiert. Ovalicinbehandelte Zellen waren 57% ihres Zellzyklus (in diesem Experiment 31 h) $2 \cdot 10^{-7}\text{M}$ Ovalicin ausgesetzt.

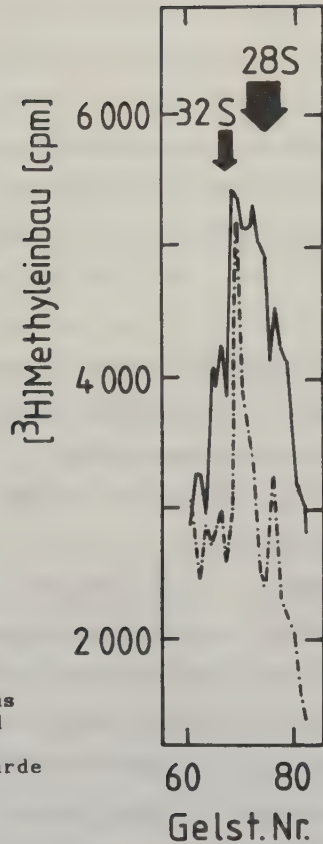


Fig. 15: 32 - 28S Bereich im Gel
fraktionierter KernRNA aus
—— ovalicinbeh. Zellen und
----- unbeh. Kontrollzellen.
Dieser Bereich aus beiden Gelen wurde
übereinander gezeichnet.

Die radioaktiven Gipfel des 32 - 28S Bereichs verdienen weitere Beachtung (Fig. 15) und können wie folgt interpretiert werden: der radioaktive "Berg" im Gel der KernRNA aus ovalicinbehandelten Zellen (Fig. 13) besteht aus zwei Gipfeln, die sich durch die Gelelektrophorese nicht vollständig trennen ließen und radioaktiv markierter 32S- und 28S RNA zugeordnet werden können. Im entsprechenden Bereich im Gel der RNA aus Kontrollzellen (Fig. 14) findet sich dagegen nur ein deutlich radioak-

tiv markierter Gipfel, der 32S RNA zugeordnet werden kann, radioaktiv markierter 28S RNA läßt sich dagegen - knapp über dem Zählhintergrund - nur ein kleiner Gipfel zuordnen.

Daß diese Interpretation richtig ist, konnte durch ein weiteres Experiment bewiesen werden (s.u.). Trennt man den fraglichen Bereich in beiden Gelen genau zur Hälfte und definiert damit einen 32S- und 28S Bereich, findet man im 32S Bereich der RNA ovalicinbehandelter Zellen (Gelstückchen Nr. 67-73) 35 300 cpm, im entsprechenden Bereich der Kontrollzellen (Gelstückchen Nr. 67-73) - der mit dem radioaktiv markierten 32S - RNA Gipfel zusammenfällt - 24 400 cpm, im 28S Bereich (Gelstückchen Nr. 74-80) 28 900 cpm (Ovalicin) bzw. 17 600 cpm (Kontrolle).

Man findet also in KernRNA ovalicinbehandelter Zellen wesentlich mehr radioaktiv markierte 28S RNA im Vergleich zur RNA der Kontrollzellen, aber auch mehr markierte 32S RNA, dem direkten Vorläufermolekül von 28S RNA, während das Primärtranskript mit und ohne Ovalicin annähernd gleich radioaktiv markiert wurde (Tab. 13). Das gleiche gilt für 18S RNA, die in ovalicinbehandelten Zellen gegenüber der Kontrolle auch stärker markiert wurde. Die Gesamtradioaktivität der fraktionierten KernRNA im Gel (Gelstückchen Nr. 1-131) liegt im Fall der drogenbehandelten Zellen bei 307 000 cpm gegenüber 270 000 cpm im Falle der Kontrolle (Gelstückchen Nr. 1-131). In diesem Experiment läßt sich der höhere Gehalt an Radioaktivität in KernRNA ovalicinbehandelter Zellen durch die Anhäufung der radioaktiv markierten Prozessierungsprodukte 32S-, 28S- und 18S RNA erklären.

Beobachtet man also nach kurzen Markierungszeiten mit [methyl- ^3H]Methionin (20-30 min) noch weniger radioaktiv markierte prozessierte RNAs in ovalicinbehandelten Zellen, so findet man nach 60 min Markierungsdauer den umgekehrten Fall: die Prozessierungsprodukte sind höher markiert als in den Kontrollzellen, während das 45S Primärtranskript wieder annähernd gleich stark markiert wurde.

Analysiert man in den gleichen Zellen nach 60 min Markierung mit [methyl- ^3H]Methionin den Einbau von Radioaktivität in reife 28S- und 18S rRNA im Cytoplasma, so findet man mit und ohne Ovalicin [^3H]methylmarkierte 18S rRNA (Gelstückchen Nr. 50-60), jedoch nur in den Kontrollzellen über dem Zählhintergrund nachweisbar markierte 28S rRNA (Gelstückchen Nr. 31-39) (Fig. 16 & 17). Im unteren Bereich des Geles (ca. ab Gelstückchen Nr. 100) findet man hohe Radioaktivität in tRNA (nicht in 5,8S- oder 5S rRNA, wie durch Auftrennung eines Aliquots in einem höherprozentigen Acrylamid - Harnstoffgel gezeigt werden konnte, ohne Beleg), wahrscheinlich hauptsächlich mit [methyl- ^3H]Methionin beladene tRNA_{Met}. Da die Ethanol-fällungen cytoplasmatischer RNAs - wahrscheinlich aufgrund der kleineren Mengen in größeren Volumina - nicht quantitativ ausfielen (S. 31) können keine verlässlichen Angaben darüber gemacht werden, wieviel RNA jeweils auf die Gele aufgesetzt wurde.

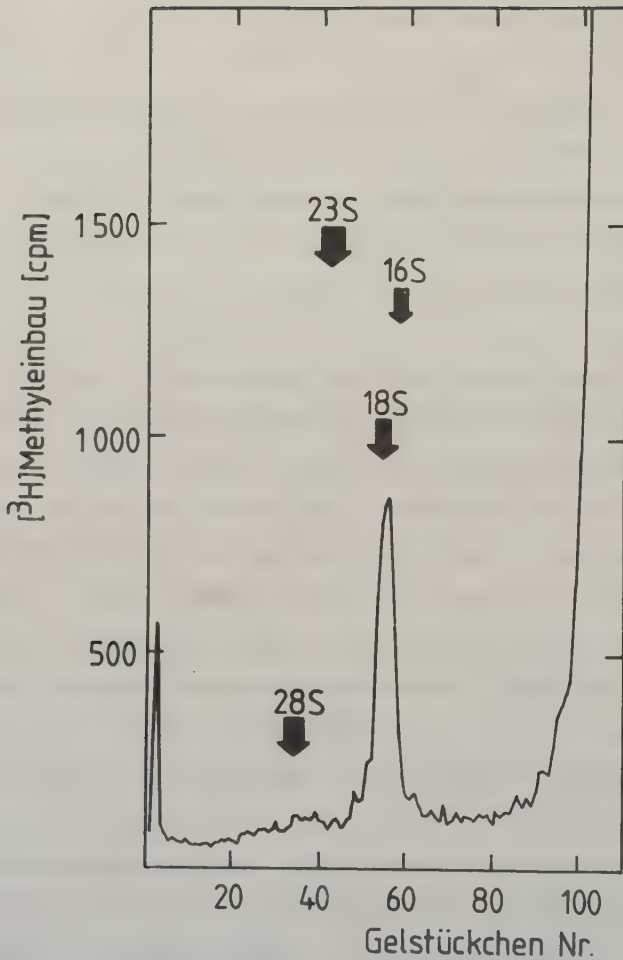


Fig. 16: Gelelektrophorese cytoplasmatischer RNA aus ovalicinbehandelten S49.1-Zellen nach 60 min Pulsmarkierung mit [methyl- ^3H]Methionin.

1,6% Agarose-2,2M Formaldehydgel. Elektrophoresedauer 19 h bei $1,4 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$ und 4°C . $2,3 \cdot 10^7$ Zellen in 11,7 ml methioninfreiem Medium wurden 60 min mit 2,5 mCi [methyl- ^3H]Methionin inkubiert. Ovalicinbehandlung $2 \cdot 10^{-7}\text{M}$, 18 h (= 57 % des Zellzyklus, in diesem Experiment 31 h). Aufgetragene Menge unbekannt (S. 31, S. 93). 23S- und 16S rRNA aus *E. coli*, 28S- und 18S rRNA aus S49.1-Zellen. Radioaktivitätsbestimmung mit NaOH/SDS (S. 36), Szintillationszählung 5 min.

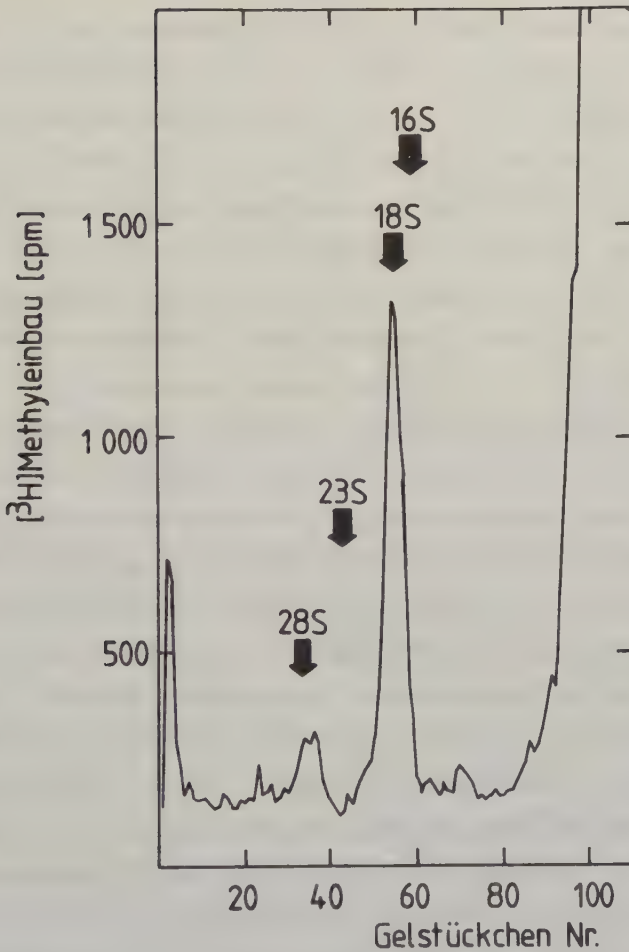


Fig. 17: Gelelektrophorese cytoplasmatischer RNA aus unbehandelten Kontrollzellen nach 60 min Pulsmarkierung mit $[\text{methyl-}^3\text{H}]\text{Methionin}$.
 1,6% Agarose - 2,2M Formaldehydgel. Elektrophoresedauer siehe Fig. 16. $2,3 \cdot 10^7$ Zellen in 11,7 ml methioninfreiem Medium wurden 60 min mit 2,5 mCi $[\text{methyl-}^3\text{H}]\text{Methionin}$ inkubiert. Aufgetragene Menge, Längenstandards und Radioaktivitätsbestimmung siehe Fig. 16.

Schließlich wurden S49.1-Zellen in methioninfreiem Kulturmedium mit und ohne Ovalicin 90 min mit je 2,5 mCi [methyl- ^3H]Methionin markiert und in gleicher Weise der Einbau der Radioaktivität in KernRNA und in cytoplasmatische RNA analysiert. Ovalicin wirkte mit 18 h 79% des Zellzyklus (diesmal 23 h) auf die Zellen ein. Am Ende der Markierung wurde beobachtet, daß sich die Zellen mit und ohne Ovalicin zu makroskopisch sichtbaren Zellaggregaten zusammenlagerten, was immer dann beobachtet wurde, wenn die Kulturbedingungen ungenügend waren. Da Methionin eine essentielle Aminosäure ist und 3 h Methioninentzug für die Zellen "absolut tödlich" sind (E. Fanning, pers. Mitt.), lag der Verdacht nahe, daß diese Beobachtung auf Methioninmangel im Medium zurückzuführen ist. [methyl- ^3H]Methionin wurde in diesem Experiment in einer spezifischen Radioaktivität von $82 \text{ Ci} \cdot \text{mmol}^{-1}$ eingesetzt. Die pro Zellkultur zugesetzten 2,5 mCi Radioaktivität entsprechen damit 30,5 nmol Methionin oder 4,7 μg (bei einer relativen Molmasse von 155 bei dieser spez. Radioaktivität). Diese 4,7 μg in 11,7 ml methioninfreiem Kulturmedium ergeben eine Methioninkonzentration von $0,4 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ und damit nur 1,3% der in Dulbecco's Modified Eagle Medium eingesetzten Konzentration von $30 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Der Methioningehalt des dialysierten Pferdeserums - das von Aminosäuren frei sein sollte - war unbekannt. Da jedoch die drogenbehandelten Zellen und die Kontrollzellen am Ende ihres Lebens gleichermaßen hungern mußten, lassen sich aus der Analyse des Einbaus von Radioaktivität in die RNA der Zellen trotzdem Aussagen über ovalicinspezifische Effekte machen.

In KernRNA ovalicinbehandelter Zellen findet man vier stark radioaktiv markierte Gipfel, in unbehandelten Kontrollzellen jedoch nur drei (Fig. 18 & 19). Leider wurde das Gel mit der RNA der Kontrollzellen mit fast 2 OD [100 µg] RNA überladen, so daß 19,5% der im Gel gemessenen Gesamtradioaktivität nicht in das Gel hineinwandern konnten (Gelstückchen Nr. 2-11, Fig. 19). Dadurch sind quantitative Aussagen in diesem Gel nicht möglich, denn es blieb unbekannt, ob alle RNA Moleküle unabhängig von ihrer Länge gleichermaßen an der Geloberfläche liegengeblieben sind. Die vier herausragend radioaktiv markierten Gipfel lassen sich in der fraktionierten KernRNA ovalicinbehandelter Zellen (Fig. 18) 45S- (Gelstückchen Nr. 41-54, 40 700 cpm), 32S- (Gelstückchen Nr. 67-76, 38 500 cpm), 28S- (Gelstückchen Nr. 76-87, 40 400 cpm) und 18S RNA (Gelstückchen Nr. 95-105, 31 000 cpm) zuordnen. Entsprechend lassen sich die drei dominant markierten RNA Gipfel im Gel der KernRNA der Kontrollzellen 45S- (Gelstückchen Nr. 43-56), 32S- (Gelstückchen Nr. 72-81) und 18S RNA (Gelstückchen Nr. 101-110) zuordnen (Fig. 19). 28S RNA ist in den Kontrollzellen - wie auch schon nach 60 min Markierung mit [methyl-³H]Methionin (Fig. 14, S. 89) - nicht oder nur gering markiert, in ovalicinbehandelten Zellen jedoch etwas höher als sein direkter Vorläufer 32S RNA. 32S-, 28S RNA und das 45S Primärtranskript sind in ovalicinbehandelten Zellen etwa gleich stark markiert, 32S RNA in Kontrollzellen dagegen deutlich weniger als 45S RNA und 28S RNA fast überhaupt nicht. Offensichtlich ist auch 18S RNA - wie ebenfalls bereits nach 60 min Inkubation mit

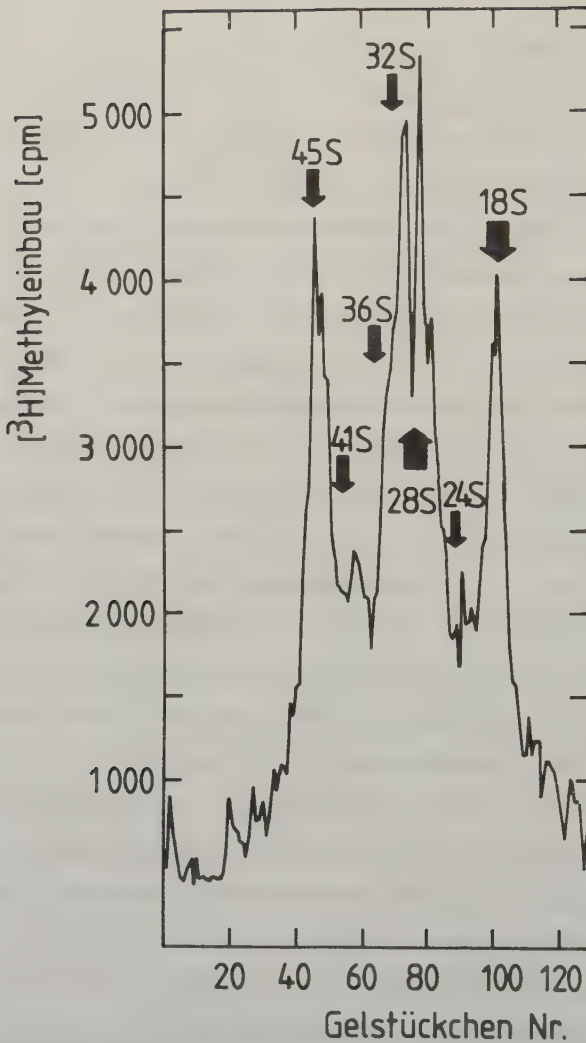


Fig. 18: Gelelektrophorese von KernRNA aus ovalicinbehandelten S49.1-Zellen nach 90 min Pulsmarkierung mit $[\text{methyl-}^3\text{H}]\text{Methionin}$.

0,8% Agarose-2,2M Formaldehydgel. Elektrophoresedauer 20 h bei $1 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$ und Raumtemperatur. $2,3 \cdot 10^7$ Zellen in 11,7 ml methioninfreiem Medium wurden 90 min mit 2,5 mCi $[\text{methyl-}^3\text{H}]\text{Methionin}$ inkubiert. Ovalicinbehandlung $2 \cdot 10^{-7} \text{ M}$, 18 h (= 79 % des Zellzyklus, in diesem Experiment 23 h). Aufgetragen wurden 1,73 OD $[87 \text{ } \mu\text{g}]$ = 33 % der isolierten KernRNA (88% der Kontrolle mit 1,97 OD, Fig. 19). Radioaktivitätsbestimmung mit NaOH / SDS, Szintillationszählung 10 min.

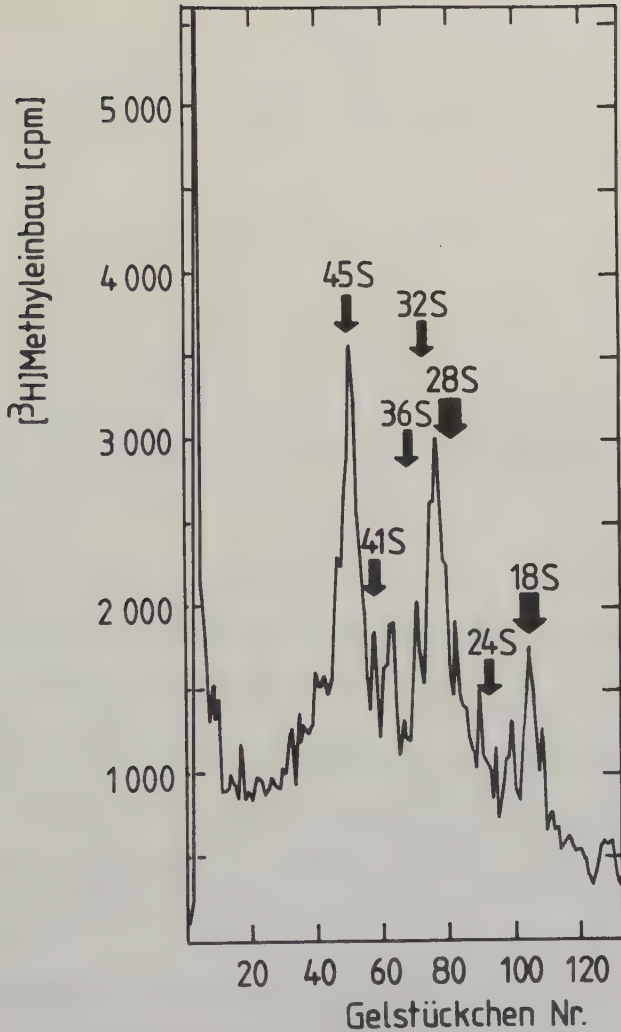


Fig. 19: Gelelektrophorese von KernRNA aus unbehandelten Kontrollzellen nach 90 min Pulsmarkierung mit $[\text{methyl-}^3\text{H}]\text{Methionin}$.

0,8% Agarose - 2,2M Formaldehydgel. Elektrophoresedauer siehe Fig. 18. $2,3 \cdot 10^7$ Zellen in 11,7 ml methioninfreiem Medium wurden 90 min mit 2,5 mCi $[\text{methyl-}^3\text{H}]\text{Methionin}$ inkubiert. Aufgetragen wurden 1,97 OD $[99 \mu\text{g}] = 33\%$ der isolierten KernRNA. Radioaktivitätsbestimmung siehe Fig. 18. 19,5% der Radioaktivität sind am Start liegengeblieben (S. 97).

[methyl- ^3H]Methionin beobachtet (Fig. 13 & 14, S.88 & 89) - in ovalicinbehandelten Zellen wesentlich höher markiert als in der Kontrolle (Fig. 18 & 19).

Analysiert man, wie 28S- und 18S rRNA nach 90 min Markierung mit [methyl- ^3H]Methionin im Cytoplasma der gleichen Zellen radioaktiv markiert wurden, findet man diesmal - neben hoch markierter tRNA - mit und ohne Ovalicin [^3H]methylmarkierte 28S- und 18S rRNA, jedoch mit unterschiedlichen Intensitäten (Fig. 20 & 21). Da die auf das Gel aufgesetzte Menge an RNA aus den genannten Gründen (S. 31, S. 93) nicht bestimmt werden konnte, kann der gemessene Einbau der Radioaktivität in die einzelnen rRNAs nur innerhalb eines Geles miteinander verglichen werden. In cytoplasmatischer 28S rRNA ovalicinbehandelter Zellen (Gelstückchen Nr. 31-42) findet man 7 150 cpm, in 18S rRNA (Gelstückchen Nr. 51-63) 19 800 cpm. In Kontrollzellen ist 28S - rRNA (Gelstückchen Nr. 31-42) mit 11 000 cpm markiert, 18S - rRNA (Gelstückchen Nr. 52-64) mit 14 600 cpm (Tab. 14).

In Kontrollzellen ist 18S rRNA damit um den Faktor 1,3 höher markiert als 28S rRNA, in ovalicinbehandelten Zellen jedoch um den Faktor 2,7.

Der Transport [^3H]methylmarkierter 28S rRNA aus den Zellkernen in das Cytoplasma verläuft demnach in ovalicinbehandelten Zellen gegenüber Kontrollzellen langsamer als der Transport von 18S rRNA.

rRNA Spezies	ovalicinbeh. Zellen		Kontrollzellen	
	Gelstück- chen Nr.	Radioakt. der Bande [cpm]	Gelstück- chen Nr.	Radioakt. der Bande [cpm]
28S	31-42	7 150 cpm	31-42	11 000 cpm
18S	51-63	19 800 cpm	52-64	14 600 cpm

Tab. 14: Eingebaute Radioaktivität in ribosomale RNA nach 90 min Markierung mit [methyl- ^3H]Methionin im Cytoplasma.

Je $2,3 \cdot 10^7$ Zellen in je 11,7 ml methioninfreiem Medium wurden mit und ohne Ovalicin 90 min mit je 2,5 mCi [methyl- ^3H]Methionin markiert. Ovalicinbehandelte Zellen waren 79% ihres Zellzyklus (in diesem Experiment 23 h) $2 \cdot 10^{-7}\text{M}$ Ovalicin ausgesetzt.

Um auszuschließen, daß die geringere radioaktive Markierung von 28S rRNA gegenüber 18S rRNA in Gegenwart von Ovalicin nicht auf einem verzögerten Transport in das Cytoplasma, sondern auf einer selektiven Untermethylierung von 28S rRNA beruht, wurden die entsprechenden Bestimmungen cytoplasmatischer RNA noch einmal mit [^3H]Uridinmarkierung durchgeführt (Fig. 22 & 23; Fig. 24).

Markiert man S49.1 Zellen mit und ohne Ovalicin 60 min mit je 250 μCi [^3H]Uridin (Zellzyklus 17 h, Ovalicin wirkte damit mit 18 h 103% eines Zellzyklus ein), so findet man - neben Radioaktivität im tRNA Bereich - in 28S rRNA ovalicinbehandelter Zellen 1 020 cpm (Gelstückchen Nr. 20-28) und in 18S rRNA 2 550 cpm (Gelstückchen Nr. 38-48) (Fig. 22). In unbehandelten Kontrollzellen ist 28S rRNA (Gelstückchen Nr. 16-24) mit

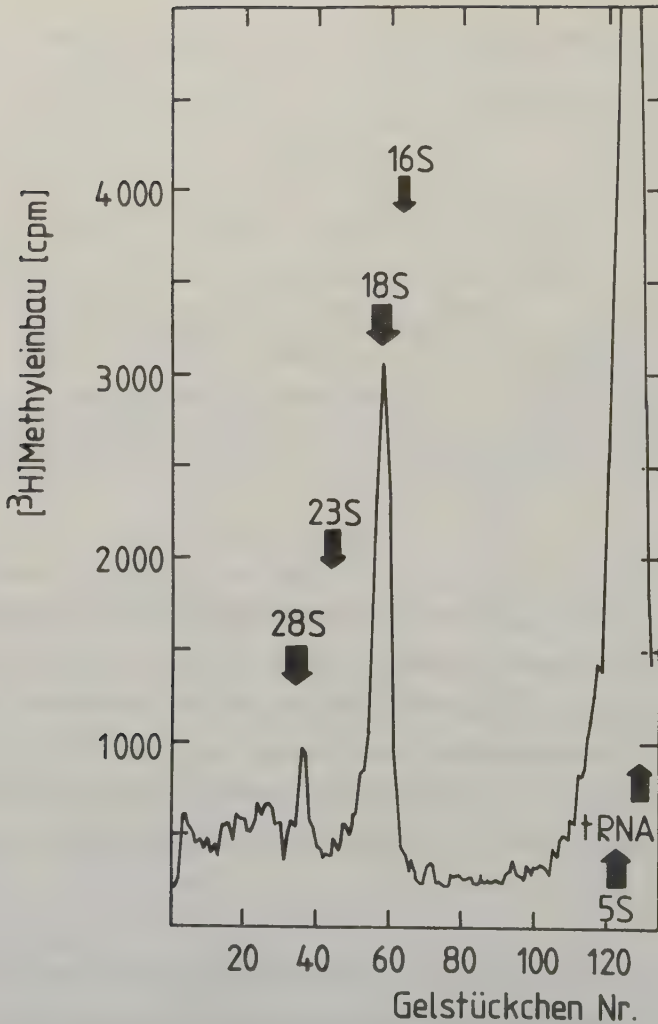


Fig. 20: Gelelektrophorese cytoplasmatischer RNA aus ovalicinbehandelten S49.1-Zellen nach 90 min Pulsmarkierung mit $[\text{methyl-}^3\text{H}]\text{Methionin}$.

1,6% Agarose-2,2M Formaldehydgel. Elektrophoresedauer 18 h bei $1,6 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$ und Raumtemperatur. $2,3 \cdot 10^7$ Zellen in 11,7 ml methioninfreiem Medium wurden 90 min mit 2,5 mCi $[\text{methyl-}^3\text{H}]\text{Methionin}$ inkubiert. Ovalicinbehandlung $2 \cdot 10^{-7} \text{ M}$, 18 h (= 79 % des Zellzyklus, in diesem Experiment 23 h). Aufgetragene Menge unbekannt (S. 31, S. 100). 23S-, 16S-, 5S rRNA und tRNA aus *E. coli*, 28S- und 18S rRNA aus S49.1 Zellen. Radioaktivitätsbestimmung mit NaOH / SDS (S. 36), Szintillationszählung 10 min.

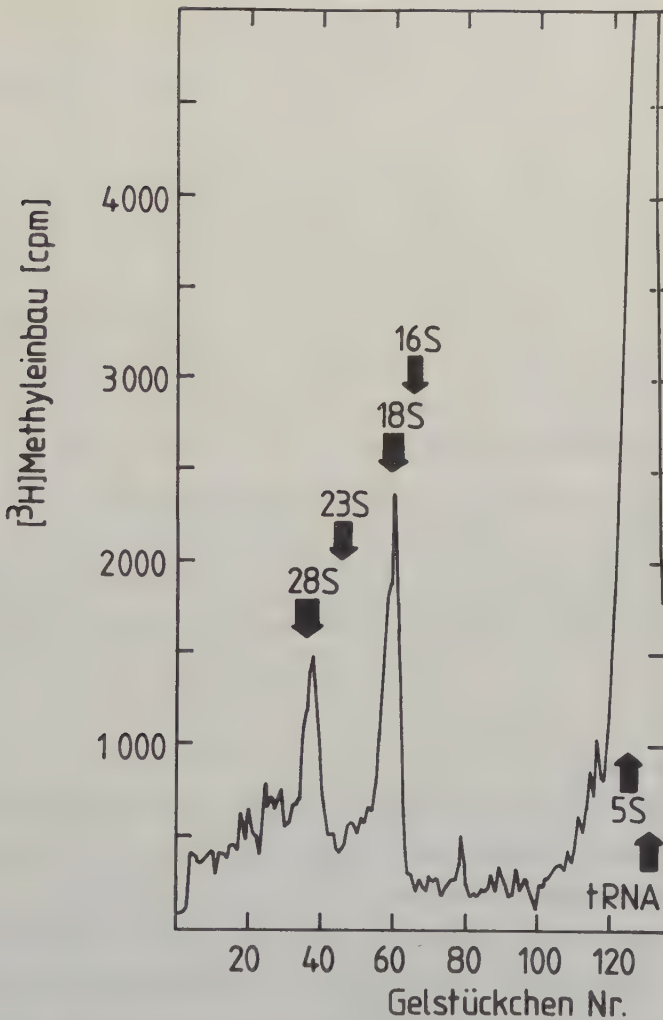


Fig. 21: Gelelektrophorese cytoplasmatischer RNA aus unbehandelten Kontrollzellen nach 90 min Pulsmarkierung mit [methyl- ^3H]Methionin.

1,6% Agarose - 2,2M Formaldehydgel. Elektrophoresedauer siehe Fig. 20. $2,3 \cdot 10^7$ Zellen in 11,7 ml methioninfreiem Medium wurden 90 min mit 2,5 mCi [methyl- ^3H]Methionin inkubiert. Aufgetragene Menge, Längenstandards und Radioaktivitätsbestimmung siehe Fig. 20.

1 070 cpm markiert und 18S rRNA (Gelstückchen Nr. 35-45) mit 1 200 cpm (Fig. 23, unterschiedlichen Maßstab beachten!) (Tab. 15).

Abgesehen von kleinen radioaktiven Gipfeln wurden nach der Gelelektrophorese im Bereich von 28S- und 18S rRNA außer diesen keine weiteren radioaktiv markierten RNAs gefunden, die die Analyse erschweren könnten. Kleinere [^3H]markierte RNAs im Größenbereich von 80 - 160 Nukleotiden (5,8S-, 5S- rRNA, tRNA, siehe Kap. kleine RNAs) wanderten bis zum unteren Ende des Gels und störten damit auch nicht.

Der geringe Einbau von [^3H]Uridin in ribosomale RNA der Kontrollzellen (Fig. 23, Tab. 15) ist wahrscheinlich ein experimentelles Artefakt, da Ethanol-fällungen von RNA, die aus dem Cytoplasma isoliert wurde - wie bereits mehrfach erwähnt (S. 31, S. 93, S. 100) - nicht quantitativ ausfielen. An Indizien dafür seien aufgeführt, daß erstens der Einbau von [^3H]Uridin in den tRNA Bereich, der nicht wesentlich verschieden sein sollte, in den unbehandelten Kontrollzellen ebenfalls wesentlich niedriger ausfiel (Tab. 15) und zweitens zwei verschiedene Fluorographien von Aliquots dieser RNAs eine Intensitätsverteilung der Banden zeigten, die mit den übrigen Ergebnissen im Einklang stehen (Abb. 2, S. 78; Abb. 3, S. 109). Vergleicht man die Einbauraten von [^3H]Uridin in die rRNAs in einem Gel miteinander, so findet man für das Verhältnis von 18S- zu 28S rRNA von ovalicin-behandelten Zellen einen Wert von 2,5 (2 550 : 1 020), während in unbehandelten Kontrollzellen beide rRNAs mit einem Verhältnis von 1,1 (1 200 : 1 070) annähernd gleich stark markiert wurden (Tab. 15).

rRNA Spezies	ovalicinbeh.Zellen		Kontrollzellen	
	Gelstück- chen Nr.	Radioakt. der Bande [cpm]	Gelstück- chen Nr.	Radioakt. der Bande [cpm]
28S	20-28	1 020 cpm	16-24	1 070 cpm
18S	38-48	2 550 cpm	35-45	1 200 cpm
"tRNA"	81-100	15 100 cpm	83-102	6 200 cpm

Tab. 15: Kingebaute Radioaktivität in ribosomale RNA nach 60 min Markierung mit [^3H]Uridin im Cytoplasma.

Je $1,4 \cdot 10^7$ Zellen in je 11,6 ml Kulturmedium wurden mit und ohne Ovalicin 60 min mit je 250 μCi [^3H]Uridin markiert. Ovalicinbehandelte Zellen waren 103% ihres Zellzyklus (in diesem Experiment 17 h) $2 \cdot 10^{-7}\text{M}$ Ovalicin ausgesetzt. Wegen der geringen Einbauraten von Radioaktivität wurden alle Proben 10 min im Szintillationszähler gezählt. "tRNA" = 5,8S-, 5S rRNA und tRNA.

Dieses Ergebnis ist eine Bestätigung des Experimentes, in dem cytoplasmatische rRNA nach 90 min Markierung mit [methyl- ^3H]-Methionin analysiert wurde (Fig. 20 & 21, S. 102 & 103). In beiden Versuchen wird eine ähnliche Intensitätsverteilung der radioaktiven Markierung beobachtet, die die Annahme stützt, daß 28S rRNA in ovalicinbehandelten Zellen langsamer als 18S - rRNA im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen in das Cytoplasma transportiert wird (S. 100).

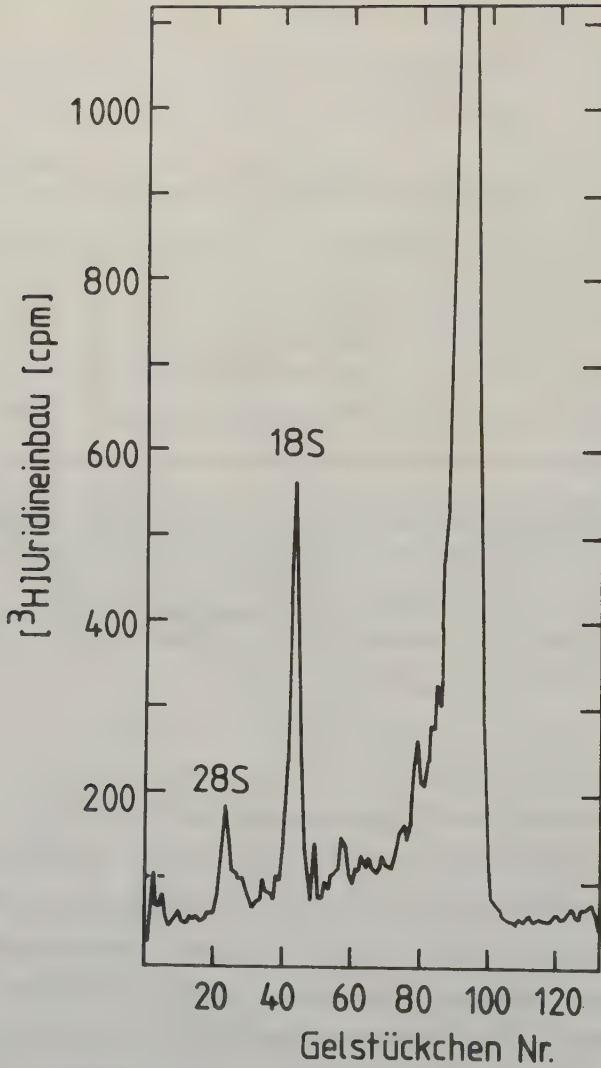


Fig. 22: Gelelektrophorese cytoplasmatischer RNA aus ovalicinbehandelten S49.1-Zellen nach 60 min Pulsmarkierung mit $[^3\text{H}]$ Uridin.

1,6% Agarose-2,2M Formaldehydgel. Elektrophoresedauer 19 h bei $1 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$ und Raumtemperatur. $1,5 \cdot 10^7$ Zellen in 11,6 ml Kulturmedium wurden 60 min mit $250 \text{ } \mu\text{Ci } [^3\text{H}]$ Uridin inkubiert. Ovalicinbehandlung $2 \cdot 10^{-7} \text{ M}$, 18 h (= 103 % des Zellzyklus, in diesem Experiment 17 h). Aufgetragene Menge unbekannt (S. 31, S. 104). Radioaktivitätsbestimmung mit NaOH / SDS, Szintillationszählung 10 min.

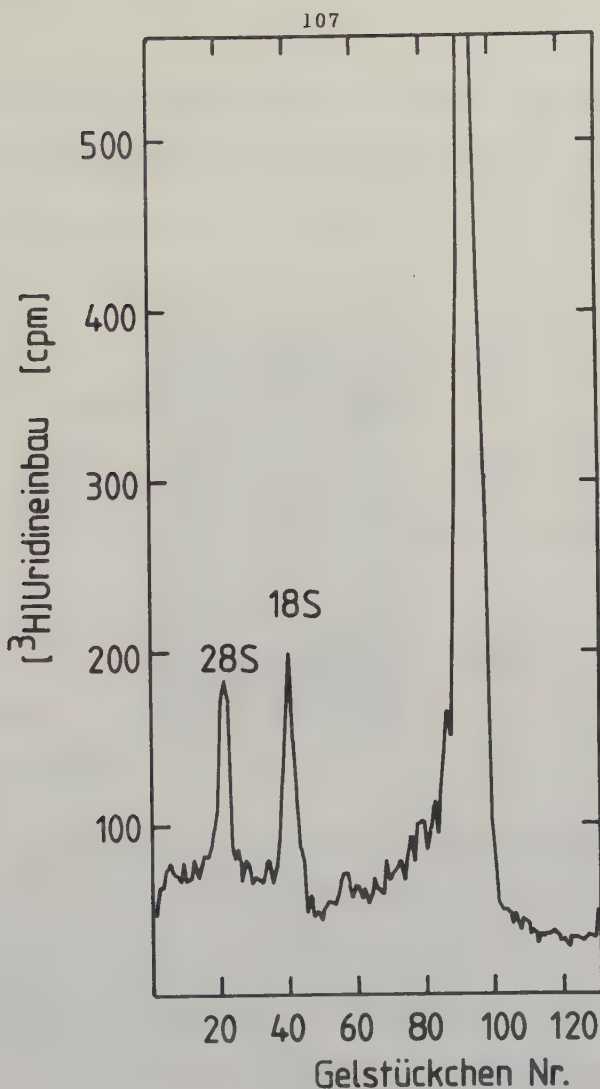


Fig. 23: Gelelektrophorese cytoplasmatischer RNA aus unbehandelten Kontrollzellen nach 60 min Pulsmarkierung mit $[^3\text{H}]$ Uridin.

1,6% Agarose - 2,2M Formaldehydgel. Elektrophoresedauer siehe Fig. 22. $1,4 \cdot 10^7$ Zellen in 11,6 ml Kulturmedium wurden 60 min mit 250 μCi $[^3\text{H}]$ Uridin inkubiert. Aufgetragene Menge und Radioaktivitätsbestimmung siehe Fig. 22. Geänderten Maßstab beachten!

Die Fluorographie eines Aliquots cytoplasmatischer RNA nach 60 min Markierung mit [^3H]Uridin veranschaulicht diesen Effekt (Abb. 3). Während in unbehandelten Kontrollzellen 28S rRNA und 18S rRNA etwa gleich stark markiert wurden (rechte Spur), wurde 28S rRNA in ovalicinbehandelten Zellen (linke Spur) wesentlich geringer markiert als 18S rRNA.

Es ist jedoch anzumerken, daß der Röntgenfilm nicht vorbelichtet wurde und damit Radioaktivität und Schwärzung des Filmes bei niedrigen Intensitäten nicht mehr linear verlaufen (Laskey & Mills, 1977; Laskey, 1984). Schwach markierte Banden werden dadurch unterrepräsentiert.

Eine letzte Bestätigung brachte eine 90 min Markierung der Zellen mit und ohne Ovalicin mit je 250 μCi [^3H]Uridin (Einwirkdauer der Droge 95% des Zellzyklus von 19 h). Im Cytoplasma der Zellen findet man in 28S rRNA ovalicinbehandelter Zellen 12 700 cpm (Gelstückchen Nr. 28-38), in 18S rRNA 18 500 cpm (Gelstückchen Nr. 50-62), in den Kontrollzellen 28 400 cpm in 28S rRNA (Gelstückchen Nr. 28-38) und 23 100 cpm in 18S rRNA (Gelstückchen Nr. 53-65) (Fig. 24, Tab. 16).

Findet man also in ribosomaler RNA der Kontrollzellen im Cytoplasma 28S rRNA höher markiert als 18S rRNA, so ist es im Falle der drogenbehandelten Zellen gerade umgekehrt.

Zwei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente (Fig. 13 & 14, S. 88 & 89 und Fig. 18 & 19, S. 98 & 99) zeigen, daß nach längeren Markierungszeiten mit [methyl- ^3H]Methionin (60 - 90 min) im Zellkern ovalicinbehandelter S49.1 Zellen 28S RNA,

sein direkter Vorläufer 32S RNA und 18S RNA im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen signifikant angehäuft werden.

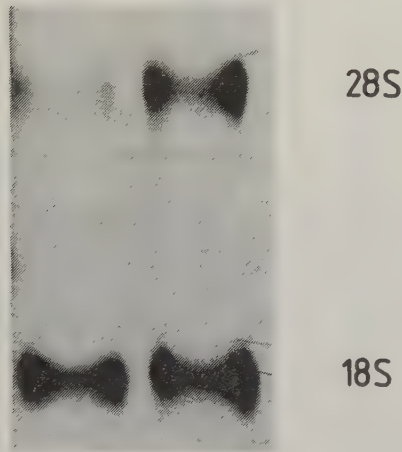


Abb. 3: Fluorographie cytoplasmatischer RNA aus S49.1-Zellen nach 60 min Pulsmarkierung mit [^3H]Uridin nach Gelelektrophorese.

0,8% Agarose-2,2M Formaldehydgel. Elektrophoresedauer 19 h bei $1 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$ und Raumtemperatur. $1,4 \cdot 10^7$ Zellen in 11,6 ml Kulturmedium wurden 60 min mit je 250 μCi [^3H]Uridin inkubiert. Linke Spur: ovalicinbehandelte Zellen (siehe Fig. 22) Rechte Spur: unbehandelte Kontrollzellen (siehe Fig. 23) Aufgetragene Menge unbekannt (S. 31, S. 104), Auftragsstelle nicht abgebildet. KODAK XAR-5, 12 Tage exponiert (-70°C), nicht vorbelichtet.

Dies legt die Vermutung nahe, daß der Transport von 28S- und 18S RNA - in Form der ribosomalen Untereinheiten 60S und 40S - in das Cytoplasma durch Ovalicin behindert wird. Für 28S RNA

rRNA Spezies	ovalicinbeh.Zellen		Kontrollzellen	
	Gelstück- chen Nr.	Radioakt. der Bande [cpm]	Gelstück- chen Nr.	Radioakt. der Bande [cpm]
28S	28-38	12 700 cpm	28-38	28 400 cpm
18S	50-62	18 500 cpm	53-65	23 100 cpm

Tab. 16: Ringe baute Radioaktivität in ribosomale RNA nach 90 min Markierung mit $[^3\text{H}]$ Uridin im Cytoplasma. $1,4 \cdot 10^7$ Zellen (Ovalicin) bzw. $1,5 \cdot 10^7$ Zellen (Kontrolle) in je 11,6 ml Kulturmedium wurden mit und ohne Ovalicin 90 min mit je 250 μCi $[^3\text{H}]$ Uridin markiert. Ovalicinbehandelte Zellen waren 95% ihres Zellzyklus (in diesem Experiment 19 h) $2 \cdot 10^{-7}\text{M}$ Ovalicin ausgesetzt.

kann der verzögerte Transport in das Cytoplasma in vier voneinander unabhängigen Experimenten (Fig. 16 & 17, S. 94 & 95; Fig. 20 & 21, S. 102 & 103; Fig. 22 & 23, S. 106 & 107 und Fig. 24) in Gegenwart von Ovalicin auch bestätigt werden. Dort kann gezeigt werden, daß radioaktiv markierte 28S rRNA langsamer als 18S rRNA im Cytoplasma erscheint.

Wahrscheinlich wird auch - in geringerem Maße - der Transport von 18S rRNA in das Cytoplasma durch Ovalicin behindert. Dies konnte jedoch nicht bewiesen werden.

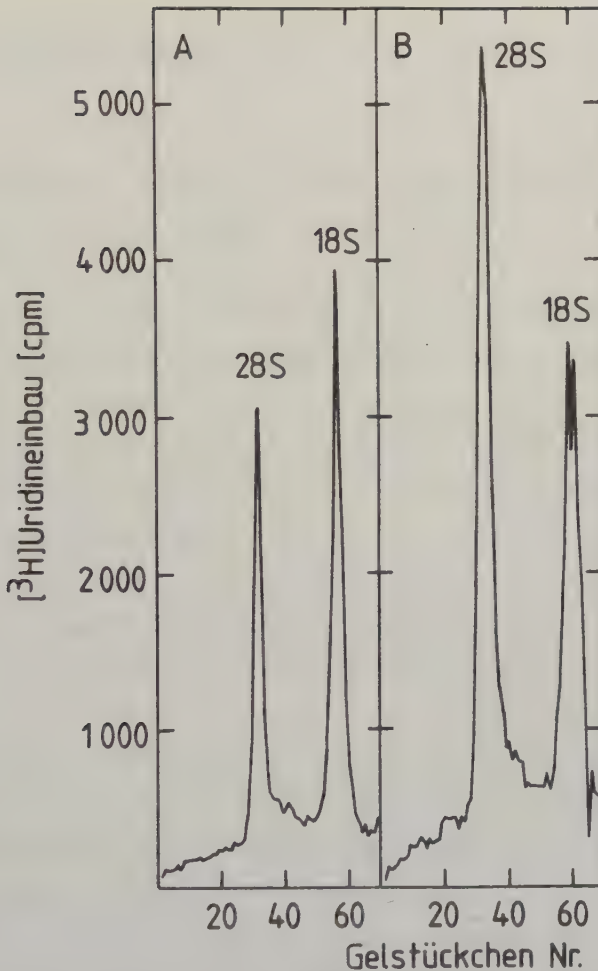


Fig. 24: Gelelektrophorese cytoplasmatischer RNA aus S49.1-Zellen nach 90 min Pulsmarkierung mit [³H]Uridin. 1,6% Agarose-2,2M Formaldehydgel. Elektrophoresedauer 21 h bei 1 V·cm⁻¹ und Raumtemperatur. Markierung 90 min mit je 250 µCi [³H]Uridin. Aufgetragene Menge unbekannt (S. 31, S. 104). Radioaktivitätsbestimmung mit NaOH / SDS (S. 36), Szintillationszählung 10 min.

A: ovalicinbehandelte Zellen: 2·10⁻⁷M Ovalicin, 18 h = 95% eines Zellzyklus, in diesem Experiment 19 h. 1,4·10⁷ Zellen in 11,6 ml Medium.

B: unbehandelte Kontrollzellen. 1,5·10⁷ Zellen in 11,6 ml Medium.

Methylierung ribosomaler RNA

Durch Inkubation von S49.1 Zellen mit [methyl- ^3H]Methionin als radioaktive Vorstufe gelingt es, selektiv ribosomale RNA radioaktiv zu markieren und deren Stoffwechsel zu untersuchen (Wolf & Schlessinger, 1977) (siehe Kap. Prozessieren ribosomaler RNA, Kap. Transport ribosomaler RNA in das Cytoplasma).

Jedoch kann mit dieser Methode nicht unterschieden werden, ob ein veränderter Einbau von Radioaktivität in eine RNA auf einer Veränderung ihrer Synthese oder auf einer Veränderung ihrer Methylierung beruht.

Daher lag es nahe, analoge Experimente mit [^3H]Uridin als radioaktive Vorstufe durchzuführen und die Synthese der ribosomalen RNA - unabhängig von ihrer Methylierung - zu untersuchen.

Vergleicht man schließlich den Einbau der beiden radioaktiven Vorstufen in die einzelnen RNA Spezies mit und ohne Ovalicin, sollte es möglich sein, einen Einfluß von Ovalicin auf die Methylierung der ribosomalen RNA zu erkennen.

Pulsmarkierungen mit [^3H]Uridin haben jedoch den Nachteil, daß alle im Zellkern vorkommenden Ribonukleinsäuren markiert werden. Radioaktiv markierte hnRNA erhöht mindestens den unspezifischen Zählhintergrund und auch sämtliche Spacersequenzen ribosomaler RNA werden markiert. Ob in S49.1 Zellen größere Mengen einer spezifischen mRNA gebildet werden, war unbekannt.

In einem Experiment wurden S49.1 Zellen mit und ohne Ovalicin 30 min mit je 250 μCi [^3H]Uridin inkubiert. Ovalicinbehandelte Zellen waren 88% eines Zellzyklus (diesmal 21 h) der Droge ausgesetzt. Analysiert man wieder die Verteilung der eingebauten Radioaktivität auf die einzelnen RNA Spezies im Zellkern nach Auftrennung in einem Agarose - Formaldehydgel, so findet man in der RNA, die aus Kontrollzellen isoliert wurde (Fig. 26), ein Muster, das in etwa dem in den Methylierungsexperimenten gefundenen entspricht (Fig. 8, S. 67; Fig. 10, S. 73; Fig. 14, S. 89; Fig. 19, S. 99). Wiederum am stärksten radioaktiv markiert ist das 45S Primärtranskript ($>45\,400\text{ cpm}^1$) bzw. $>25\,300\text{ cpm}$ pro aufgetragene OD GesamtkernRNA (1,80 OD), Gelstückchen Nr. 39-51) gefolgt von einer - nicht unerwarteten - Vielzahl weiterer schwächer markierter Banden, von denen sich einige (41S-, 32S-, 18S RNA) ribosomalen pre RNAs zuordnen lassen. 30 min nach Synthese des Primärtranskripts hat also bereits - ebenso wie 30 min nach der Methylierung (Fig. 8, S. 67) - die Prozessierung des 45S Vorläufers begonnen.

In KernRNA ovalicinbehandelter Zellen ist die eingebaute Radioaktivität jedoch wesentlich anders verteilt (Fig. 25; vgl. Fig. 7, S. 66 oder Fig. 9, S. 72 nach Methioninmarkierung). Man beobachtet eine Vielzahl radioaktiv markierter Gipfel, die sich nicht so ohne weiteres den bekannten rRNA Spezies zuordnen lassen. Am stärksten markiert ist diesmal nicht das 45S - Vorläufermolekül, sondern mehrere Banden in der Mitte des Ge-

¹⁾ Am Start des Geles der RNA aus Kontrollzellen (Gelstückchen Nr.1-10) blieben 15% der im Gel "sichtbaren" Radioaktivität auf der Geloberfläche liegen, da das Gel wahrscheinlich überladen wurde (aufgesetzt wurden 1,80 OD [90 μg]).

les zwischen 36S- und 24S RNA. In diesem Bereich (Gelstückchen Nr. 52-90) liegen 46% der im Gel "sichtbaren" Radioaktivität, im entsprechenden Bereich des Geles, in dem RNA aus unbehandelten Kontrollzellen aufgetrennt wurde (Fig. 26), nur 32%. 45S - RNA aus ovalicinbehandelten Zellen (Gelstückchen Nr. 39-51) enthält nur 26 600 cpm Radioaktivität (bzw. 18 000 cpm pro OD aufgetragener GesamtkernRNA {1,48 OD}) und enthält damit - im Gegensatz zu den Methylierungsexperimenten - weniger ²⁾ als 70% der Radioaktivität der entsprechenden RNA der Kontrollzellen.

Es bestand die Möglichkeit, daß diese (unerwartete) Verteilung der Radioaktivität in Gegenwart von Ovalicin durch eine unsaubere Aufarbeitung der Proben verursacht wurde. Spuren von Ribonukleasen in einer Lösung könnten zu einem partiellen Abbau des - aufgrund seiner Länge besonders empfindlichen - 45S - RNA Moleküls geführt haben und so die vergleichsweise geringe Radioaktivität der Bande erklären.

Daher wurde das Experiment wiederholt. Da es qualitativ das gleiche Ergebnis brachte (ohne Beleg), wurde ein durch die experimentelle Aufarbeitung verursachter Abbau als unwahrscheinlich betrachtet. Denn in acht voneinander unabhängigen Experimenten (außer diesen beiden) wurde nur in einem Fall - bei der Isolierung der KernRNA ovalicinbehandelter Zellen - ein Abbau von 45S RNA durch unsauberes Arbeiten beobachtet. Die KernRNA der Kontrollzellen war jedoch nicht abgebaut und eine Wiederholung des Experimentes lieferte in beiden Fällen vergleichbare Radioaktivität in beiden 45S RNA Banden.

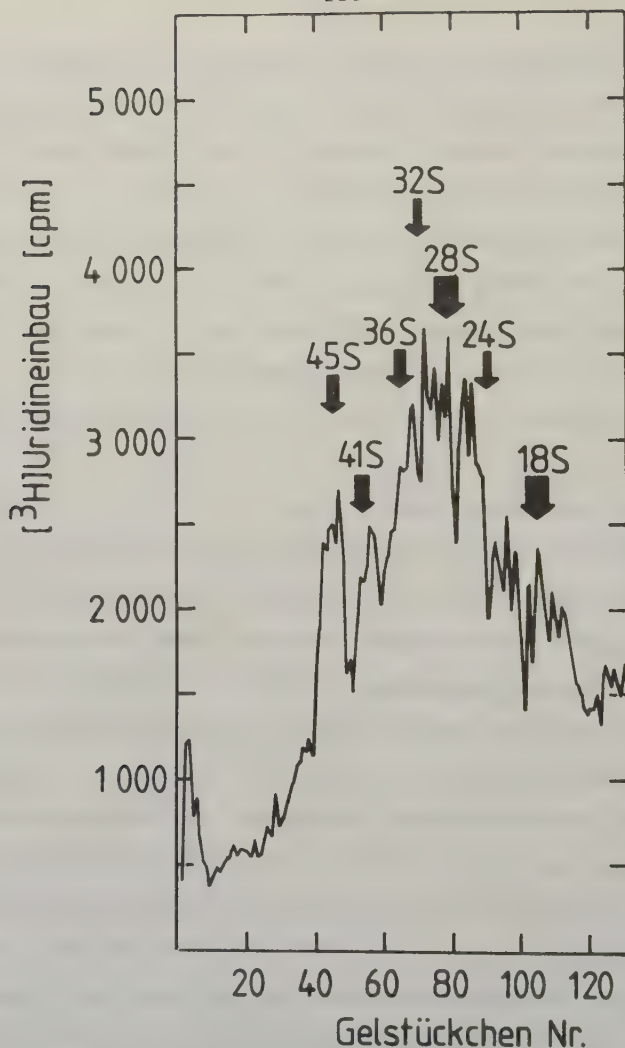


Fig. 25: Gelelektrophorese von KernRNA aus ovalicinbehandelten S49.1 Zellen nach 30 min Pulsmarkierung mit $[^3\text{H}]$ Uridin.

0,8% Agarose-2,2M Formaldehydgel. Elektrophoresedauer 21 h bei $1 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$ und Raumtemperatur. $1,3 \cdot 10^7$ Zellen in 11,7 ml Kulturmedium wurden 30 min mit 250 μCi $[^3\text{H}]$ Uridin inkubiert. Ovalicinbehandlung $2 \cdot 10^{-7} \text{ M}$, 18 h (= 88 % des Zellzyklus, in diesem Experiment 21 h). Aufgetragen wurden 1,48 OD $[74 \mu\text{g}]$ = 25 % der isolierten KernRNA. Radioaktivitätsbestimmung mit NaOH / SDS (S. 36), Szintillationszählung 5 min.

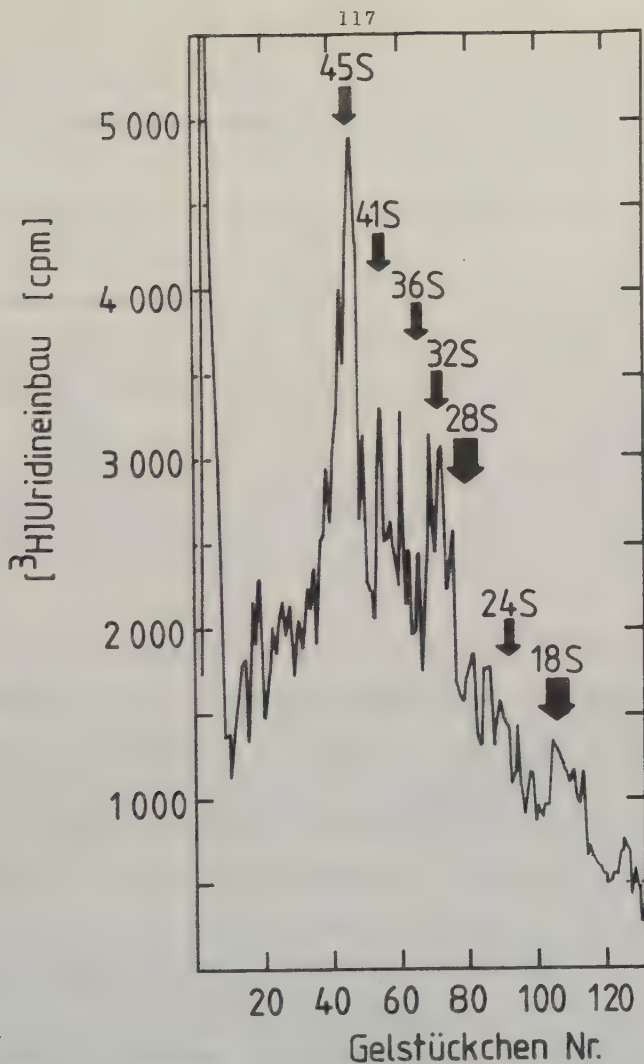


Fig. 26: Gelelektrophorese von KernRNA aus unbehandelten Kontrollzellen nach 30 min Pulsmarkierung mit [³H]Uridin.

0,8% Agarose - 2,2M Formaldehydgel. Elektrophoresedauer siehe Fig. 25. $1,1 \cdot 10^7$ Zellen in 11,7 ml Kulturmedium wurden 30 min mit 250 μ Ci [³H]Uridin inkubiert. Aufgetragen wurden 1,80 OD [90 μ g] = 25% der isolierten KernRNA. Radioaktivitätsbestimmung siehe Fig. 25. 15% der aufgetragenen Radioaktivität sind am Start des Gels liegengeblieben.

Ein weiterer Hinweis für die Signifikanz dieses Ergebnisses ist ein Experiment, das mit 60 min [^3H]Uridinmarkierung durchgeführt wurde (s.u.)

Während die beiden radioaktiven Vorstufen [methyl- ^3H]Methionin und [^3H]Uridin in S49.1 Zellen, die nicht mit Ovalicin behandelt wurden, vergleichbar in die einzelnen RNAs eingebaut werden (vergl. Fig. 8, S. 67 mit Fig. 26), findet man in Gegenwart von Ovalicin signifikante Unterschiede in der Verteilung der eingebauten Radioaktivität (vgl. Fig. 7, S. 66 mit Fig. 25). Ovalicin verändert also offensichtlich das Methylierungsmuster ribosomaler RNA in S49.1 Zellen. Dies wird an späterer Stelle (S. 143 - 150) ausführlich diskutiert.

In einem weiteren Experiment wurden S49.1-Zellen mit und ohne Ovalicin 60 min mit je 250 μCi [^3H]Uridin markiert. In KernRNA ovalicinbehandelter Zellen (Fig. 27) findet man danach 28 700 cpm im 45S pre rRNA Gipfel (Gelstückchen Nr. 30-41) und 20 900 cpm in einem Gipfel, der sich 41S RNA zuordnen läßt (Gelstückchen Nr. 42-50). Es folgen je zwei Gipfel im 32S Bereich (zusammen 37 800 cpm, Gelstückchen Nr. 53-64) und je zwei Gipfel im 28S Bereich (zusammen 43 400 cpm, Gelstückchen Nr. 64-76). 18S RNA (Gelstückchen Nr. 92-105) ist mit 24 600 cpm markiert. In fraktionierter KernRNA aus Kontrollzellen (Fig. 28, unterschiedlichen Maßstab beachten) findet man 75 000 cpm in 45S RNA (Gelstückchen Nr. 31-42), 40 400 cpm in 41S RNA (Gelstückchen Nr. 43-51), 73 800 cpm in einem Gipfel zwischen 36S- und 32S RNA (Gelstückchen Nr. 54-65), 73 000 cpm in einem Gipfel im 28S Bereich (Gelstückchen Nr.

65-77) und schließlich 36 400 cpm in 18S RNA (Gelstückchen Nr. 95-107) (Zusammenfassung in Tab. 17).

RNA Spezies	ovalicinbeh. Zellen		Kontrollzellen	
	Gelstückchen Nr.	Radioakt. der Bande [cpm]	Gelstückchen Nr.	Radioakt. der Bande [cpm]
45S	30-41	28 700 cpm	31-42	75 000 cpm
41S	42-50	20 900 cpm	43-51	40 400 cpm
32S	53-64	37 800 cpm ¹	54-65	73 800 cpm ²
28S	64-76	43 400 cpm ¹	65-77	73 000 cpm ³
18S	92-105	24 600 cpm	95-108	36 400 cpm
Σ	1-136	235 000 cpm	1-136	438 000 cpm

Tab. 17: Eingebaute Radioaktivität in ribosomale RNA nach 60 min Markierung mit [³H]Uridin im Zellkern.

Je $1,45 \cdot 10^7$ Zellen in je 11,6 ml Kulturmedium wurden mit und ohne Ovalicin 60 min mit je 250 μ Ci [³H]Uridin markiert. Ovalicinbehandelte Zellen waren 93% ihres Zellzyklus (in diesem Experiment 20 h) $2 \cdot 10^{-7}$ M Ovalicin ausgesetzt.

¹⁾ zwei Gipfel ²⁾ Gipfel im 36-32S Bereich ³⁾ Gipfel im 28S - Bereich

Zunächst fällt auf, daß in fraktionierter KernRNA ovalicinbehandelter Zellen (Σ 235 000 cpm, Tab. 17) im Vergleich zu RNA der Kontrollzellen (Σ 438 000 cpm) wesentlich weniger (54%) [³H]Uridin eingebaut wurde. Da heteronukleare KernRNAs (hnRNA) in allen Experimenten nicht abgetrennt wurden und nach Brandhorst & McConkey (1974) 58% der RNA Synthese im Zellkern ausmachen (vgl. S. 50), spricht dieses Experiment für die Vermutung, daß nicht nur die RNA Polymerase I vermittelte rRNA Syn-

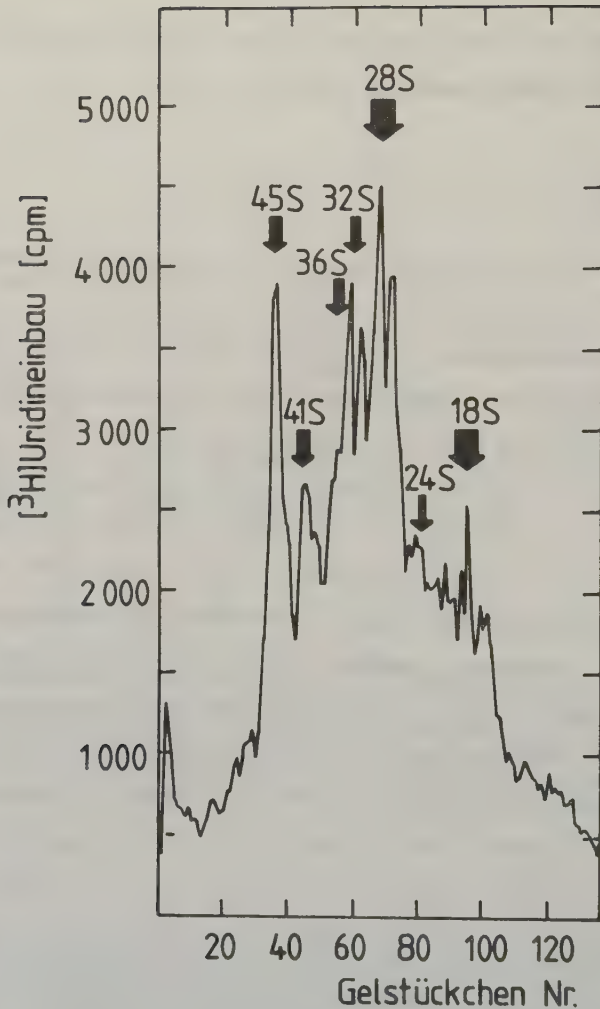


Fig. 27: Gelelektrophorese von KernRNA aus ovalicinbehandelten S49.1-Zellen nach 60 min Pulsmarkierung mit $[^3\text{H}]$ Uridin.

0,8% Agarose-2,2M Formaldehydgel. Elektrophoresedauer 27 h bei $1 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$ und Raumtemperatur. $1,45 \cdot 10^7$ Zellen in 11,6 ml Kulturmedium wurden 60 min mit 250 μCi $[^3\text{H}]$ Uridin inkubiert. Ovalicinbehandlung $2 \cdot 10^{-7} \text{ M}$, 18 h (= 93 % des Zellzyklus, in diesem Experiment 20 h). Aufgetragen wurden 1,09 OD $[54 \mu\text{g}]$ = 25 % der isolierten KernRNA. Radioaktivitätsbestimmung mit NaOH / SDS (S. 36), Szintillationszählung 10 min.

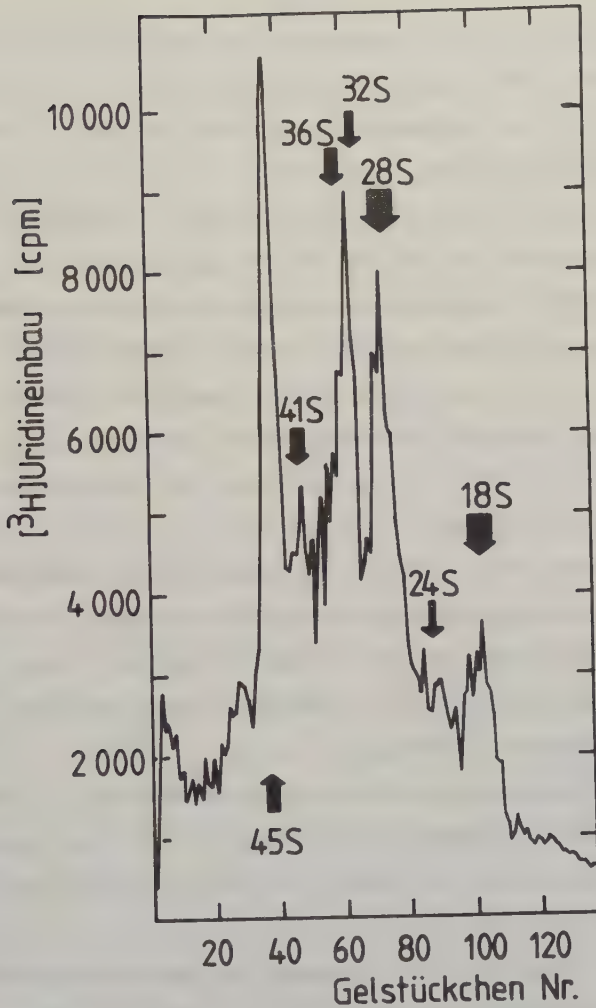


Fig. 28: Gelelektrophorese von KernRNA aus unbehandelten Kontrollzellen nach 60 min Pulsmarkierung mit $[^3\text{H}]$ Uridin.

0,8% Agarose - 2,2M Formaldehydgel. Elektrophoresedauer siehe Fig. 27. $1,45 \cdot 10^7$ Zellen in 11,6 ml Kulturmedium wurden 60 min mit 250 μCi $[^3\text{H}]$ Uridin inkubiert. Aufgetragen wurden 1,24 OD $[62 \mu\text{g}]$ = 25% der isolierten KernRNA. Radioaktivitätsbestimmung siehe Fig. 27.

these, sondern auch die Synthese von RNA Polymerase II Transkripten durch Ovalicin reduziert wird (vgl. S. 86).

Während 45S RNA in unbehandelten Kontrollzellen (75 000 cpm) und die beiden Gipfel im 36 - 28S Bereich etwa gleich stark markiert sind (73 800 cpm und 73 000 cpm), ist 45S RNA in ovalicinbehandelten Zellen mit 28 700 cpm weniger stark markiert als die beiden Doppelgipfel im 32S- bzw. 28S Bereich des Geles mit zusammen 37 800 cpm bzw. 43 400 cpm (Tab. 17). Diese Verteilung der Radioaktivität ähnelt derjenigen, die nach 30 min Markierung der Zellen mit [^3H]Uridin beobachtet wurde (Fig. 25 & 26, S. 116 & 117) und stützt damit die Signifikanz dieses Ergebnisses (S. 118).

Die Anhäufung von 28S RNA im Zellkern ovalicinbehandelter Zellen - wie nach 60 - 90 min Markierung mit [methyl- ^3H]Methionin beobachtet wurde (Fig. 13 & 14, S. 88 & 89; Fig. 18 & 19, S. 98 & 99) - konnte in diesem Experiment aus zwei Gründen nicht nachgewiesen werden:

1. Im 28S Bereich fraktionierter KernRNA ovalicinbehandelter Zellen (Fig. 27) befinden sich zwei Gipfel. Der Vergleich mit den RNA Banden aus Abb. 1 (S. 37) ist zu ungenau, um eine dieser Banden 28S RNA zuordnen zu können.
2. Im 28S Bereich fraktionierter RNA der Kontrollzellen (Fig. 28) befindet sich - im Gegensatz zu [^3H]methylmarkierter RNA (Fig. 14, S. 89; Fig. 19, S. 99) - ebenfalls ein hoher radioaktiver Gipfel.

Das Ergebnis widerspricht jedoch nicht den 60 - 90 min Pulsmarkierungsexperimenten mit [methyl- ^3H]Methionin, denn wahr-

scheinlich handelt es sich bei diesem Gipfel gar nicht um 28S RNA, sondern um eine etwas kürzere RNA Spezies.

Die Maxima der beiden Gipfel im Bereich der 32S- und 28S RNA (Fig. 28) sind bei ca. 7 cm Wanderungsstrecke im Gel 10 mm voneinander entfernt (genauer: 10x die Dicke eines Gelstückchens von ca. 1 mm), während die Entfernung der Maxima von 32S- und 28S RNA in den Experimenten mit [methyl- ^3H]Methioninmarkierung bei der etwa gleichen Wanderungsstrecke nur 4 mm (Fig. 13, S. 88) bzw. 5 mm (Fig. 18, S. 98) betrug.

Die Länge des externen transkribierten spacers wurde von Wellauer & David (1975) und Dabeva *et al.* (1978) (zitiert bei Bach *et al.*, 1981) auf 4 400 Nukleotide geschätzt ³⁾, ist damit also etwas kürzer als 28S RNA mit 4 700 Nukleotiden (4 712, Hassouna *et al.*, 1984). Dieser spacer ist auch relativ stabil, wie Bowman *et al.* (1981) zeigten. Es könnte sich demnach - neben radioaktiv markierter 32S RNA - bei dem radioaktiven Gipfel im 28S Bereich der RNA der Kontrollzellen neben gering markierter 28S RNA um den abgetrennten externen transkribierten spacer handeln, der ja mit [^3H]Uridin - im Gegensatz zu [methyl- ^3H]Methionin - ebenfalls markiert wird.

Möglich ist auch folgende Interpretation der vier Gipfel im 32S- und 28S Bereich der RNA ovalicinbehandelter Zellen (Fig. 27): 34S RNA, der von Dudov *et al.* (1978) postulierte und von Bowman *et al.* (1981) identifizierte Vorläufer von 20S-

³⁾ Der externe transkribierte spacer wird in der Literatur öfters mit "24S RNA" bezeichnet (Wellauer & David, 1973, 1975; Winicov & Perry, 1975; Bach *et al.*, 1981; Bowman *et al.*, 1981; Bowman *et al.*, 1983). Die Bande in Fig. 28 wandert jedoch nicht mit 24S RNA (Abb. 1, S. 37) auf einer Höhe

und damit 18S RNA nach endonukleolytischer Spaltung des 45S - Primärtranskriptes an Position Nr. 3 (Fig. 30, S. 137), gefolgt von 32S RNA, angehäufter 28S RNA (entsprechend Fig. 13, S. 88; Fig. 18, S. 98) und dem externen transkribierten spacer (wenn die obige Interpretation zutrifft).

Aus den hier genannten Gründen ist eine zuverlässige Bestimmung des 28S RNA Gehaltes im Zellkern bei Markierung mit [^3H]-Uridin nicht möglich. Daher kann bei dieser Markierung auch ein Anhäufen der 28S RNA im Zellkern nicht beobachtet werden.

DISKUSSION

Versuchsbedingungen

Wahl der Konzentration des Ovalicins

Ovalicin wurde in allen Experimenten, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, in einer Konzentration von $2 \cdot 10^{-7} \text{M}$ ($60 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$) eingesetzt. Dadurch war der Vergleich mit früheren Experimenten möglich, die ebenfalls in dieser Ovalicinkonzentration durchgeführt wurden. Sie wurde nicht erhöht, da selbst nach der Einwirkung der 100 fachen Konzentration ($2 \cdot 10^{-5} \text{M}$) innerhalb 60 - 70 h (ca. 3,5 Zellzyklen) noch kein Unterschied zur Wachstumshemmung bei $2 \cdot 10^{-7} \text{M}$ festzustellen war (Diersch, 1982) und unspezifische Effekte - evtl. aufgrund des hydrophoben Charakters der Droge - die Analyse nicht erschweren sollten. Die Konzentration der Droge wurde auch nicht erniedrigt, da nicht ausgeschlossen werden konnte, daß die ohnehin geringen ovalicinspezifischen Effekte in den Zellen in diesem Fall noch kleiner ausfallen und damit schwieriger zu analysieren sein würden.

Wahl der Einwirkungsdauer von Ovalicin

S49.1 Zellen wurden jeweils 18 h mit Ovalicin behandelt, da in früheren Experimenten nach dieser Einwirkungsdauer erstmals

eine Abnahme des Gehalts an Ribosomen im Cytoplasma gemessen werden konnte (Diersch, 1982). Eine Wachstumshemmung konnte nach dieser Zeit im Vergleich zu Kontrollzellen jedoch noch nicht festgestellt werden (Fig. 4, S. 46). Betrachtet man den weiteren Verlauf des Wachstums in Gegenwart von Ovalicin, wird dessen langsame Wirkung auf die Proliferation der Zellen deutlich. Daher waren bei einer geringen Änderung der Einwirkungsdauer keine wesentlichen Änderungen der ovalicinspezifischen Effekte zu erwarten. Trotz der Absicht, möglichst frühe Effekte der Droge zu messen, wurde ihre Einwirkungsdauer aus den gleichen (oben genannten) Gründen nicht wesentlich verkürzt, die auch gegen eine Verringerung der Konzentration sprachen. Auf wesentlich längere Inkubationszeiten wurde verzichtet, da bereits nach 18 h Inkubationsdauer 17% der Zellen tot oder zumindest geschädigt waren und sich deren Anzahl nach längeren Einwirkungszeiten der Droge noch weiter erhöhte.

RNA Gehalt der Zellkerne

Mißt man den RNA Gehalt der Zellkerne von S49.1 Zellen nach 18 h Ovalicineinwirkung (S. 47 - 48), findet man - bezogen auf die gleiche Zellzahl - im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen $86 \pm 10\%$ der optischen Dichte (Tab. 2, S. 48). Die Ausbeuten an isolierter GesamtkernRNA waren dabei unterschiedlich und reichten in unbehandelten Kontrollzellen von 0,11 bis 0,55 OD pro 10^6 Zellen. Es wurde jedoch festgestellt, daß diese Ausbeuten stark von der Dauer der Phenol - Chloroformbe-

handlung (S. 29) beeinflusst waren. So wurden die mit Proteina-
 se K und SDS aufgeschlossenen Zellkerne in den vier Experimen-
 ten mit der Versuchsbezeichnung "M" (Tab. 2, S. 48) zweimal je
 30 min mit Phenol / Chloroform behandelt (Ausbeute $0,17 \pm 0,07$
 OD / 10^6 Zellen in unbehandelten Kontrollzellen), jedoch zwei-
 mal 60 min in den vier Experimenten, die in Tab. 2 mit "U" ge-
 kennzeichnet wurden (Ausbeute $0,42 \pm 0,09$ OD / 10^6 Zellen in
 unbehandelten Kontrollzellen). Da daraus eine zweieinhalbfache
 Steigerung der Ausbeute resultierte, lassen sich die Schwan-
 kungen in der Menge isolierter KernRNA vor allem auf die je-
 weilige Dauer und Effizienz der Phenol - Chloroformbehandlung
 zurückführen. Wichtig ist in diesem Zusammenhang, daß die bei-
 den parallelen Ansätze mit und ohne Ovalicin jeweils gleich
 aufgearbeitet wurden, was auch für die Dauer der Phenolbehand-
 lung zutrifft. Da in allen acht Experimenten eine Reduzierung
 des RNA Gehalts ovalicinbehandelter Zellen gegenüber den
 gleichzeitig aufgearbeiteten Kontrollzellen gefunden wurde,
 kann eine geringe Abnahme des RNA Gehalts (von ca. 14%) in den
 drogenbehandelten Zellen als nachgewiesen gelten.

Weiter ist zu bemerken, daß in Gegenwart von Ovalicin eine An-
 häufung von RNA im Zellkern gefunden wurde (vgl. Kap. Trans-
 port ribosomaler RNA in das Cytoplasma; vgl. S. 140-141).

Diese erhöht natürlich auch den RNA Gehalt in den Kernen ova-
 licinbehandelter Zellen und erklärt die gemessenen geringen
 Unterschiede.

Einbau radioaktiver Vorstufen in KernRNA

Werden S49.1 Zellen mit und ohne Ovalicinbehandlung 30 - 90 min mit [^3H]Uridin markiert, findet man in Gegenwart von Ovalicin eine Reduzierung des Einbaus in GesamtkernRNA um durchschnittlich 27% (Tab. 3, S. 49) und eine - von der Dauer der Markierung unabhängige - Abnahme der spezifischen Radioaktivität der GesamtkernRNA von durchschnittlich 15% (Tab. 4, S. 51).

Markiert man die Zellen mit und ohne Ovalicin 30 - 90 min mit [methyl- ^3H]Methionin, ist der Einbau [^3H]markierter Methylgruppen in KernRNA ovalicinbehandelter Zellen um durchschnittlich 30% reduziert (Tab. 5, S. 53) und die spezifische Radioaktivität der GesamtkernRNA um durchschnittlich 18% (Tab. 6, S. 54).

Um in KernRNA eingebaut werden zu können, müssen die radioaktiven Vorstufen jedoch erst von den Zellen aufgenommen und anschließend in die direkte Vorstufe umgewandelt werden. Da die Geschwindigkeit der RNA Synthese durch den Einbau von radioaktiv markiertem Uridin gemessen wird, sollen diese beiden Punkte im folgenden für Uridin diskutiert werden.

Aufnahme von Uridin

Die Wirkung von Ovalicin auf S49.1 Lymphomzellen kann in einem Kulturmedium (S. 15) beobachtet werden, das - abgesehen von einem unbekannten Gehalt im zugesetzten Pferdeserum - gar kein Uridin enthält. Die Zellen können also Uridin selbst herstellen ¹⁾ und sind auf das Vorhandensein im Medium nicht angewiesen. Setzt man dem Kulturmedium jedoch [³H]markiertes Uridin zu, um dessen Einbau in RNA zu messen, findet man in Gegenwart von Ovalicin eine verlangsamte Aufnahme durch die Zellen (Tab. 7, S. 56). *In vitro* Experimente mit isolierten Zellkernen mitogenstimulierter Lymphocyten zeigten jedoch auch eine verminderte Einbaurate von [³H]UTP in säureunlösliches Zellmaterial (Zimmermann & Hartmann, 1981). Daher ist es unwahrscheinlich, daß Ovalicin die Aufnahme von [³H]Uridin aktiv hemmt.

Als Folge einer reduzierten RNA Synthese kann sowohl die Aufnahme von im Kulturmedium angebotenem Uridin als auch die *de novo* Uridin Synthese der Zelle verlangsamt sein. Die spezifische Radioaktivität des Uridingehalts in der Zelle würde sich dann nicht ändern, wenn Aufnahme und Neusynthese gleichermaßen gehemmt wären. Die um 15% geringere spezifische Radioaktivität der KernRNA ovalicinbehandelter Zellen (Tab. 4, S. 51) kann als eine um diesen Betrag verringerte spezifische Radioaktivität des [³H]Uridingehalts interpretiert werden.

¹⁾ Pferdeserum kann durch dialysiertes Pferdeserum ersetzt werden, das frei von Uridin sein sollte (ohne Beleg)

Synthese von UTP

Der durch Ovalicin reduzierte Einbau von [^3H]UTP in RNA isolierter Zellkerne spricht auch dafür, daß die Wirkung der Droge unabhängig von der Synthese von UTP aus Uridin ist.

Zusätzlich wird der Einbau [^3H]markierter Methylgruppen in RNA durch Markierung der Zellen mit [methyl- ^3H]Methionin mit durchschnittlich 30% etwa in dem Maße gehemmt wie der Einbau von [^3H]Uridin (mit durchschnittlich 27%). Wäre die RNA Synthese nicht gehemmt, würde der reduzierte Einbau von [^3H]Uridin also lediglich auf einer von Ovalicin verursachten Verringerung der spezifischen Aktivität von [^3H]UTP im Inneren der Zelle beruhen, so dürfte die Methylierung der RNA nicht reduziert sein. Die Menge an RNA, die methyliert werden könnte, hätte sich ja dann nicht verringert. Die gemessene Reduzierung der Methylierungsrate würde demnach bedeuten, daß die spezifische Radioaktivität des [^3H]Methylgruppendonors ebenfalls reduziert sein müßte. Die von der Umwandlung des Nukleosids Uridin zu UTP unabhängige Synthese von S-Adenosylmethionin aus der Aminosäure Methionin müßte also durch Ovalicin in dem gleichen Maße gehemmt werden. Dies ist in Anbetracht der geringen Hemmstoffkonzentration nicht sehr wahrscheinlich.

Eine alleinige Hemmung der UTP Synthese aus Uridin kann außerdem weder die Veränderung des Prozessierungsmusters in S49.1 - Zellen erklären, noch die Anhäufung ribosomaler RNAs im Zellkern.

Schließlich kann eine Hemmung der UTP Synthese durch Ovalicin als Ursache seiner Wirkung nicht die Spezifizität seiner Wir-

kung gegenüber Zellen des Immunsystems (Lazáry & Stähelin, 1968; Hartmann *et al.*, 1978; Zimmermann & Hartmann, 1981) erklären.

RNA Synthese

Die spezifische Radioaktivität des intrazellulären Uridingehalts nach Markierung mit [^3H]Uridin ist durch Ovalicin möglicherweise um 15% reduziert (s.o.). Der Einbau von [^3H]Uridin ist jedoch stärker gehemmt, nämlich um durchschnittlich 27%. Der reduzierte Einbau kann demnach nicht nur auf geringer markierte Vorläufermoleküle, sondern auf eine Reduzierung der RNA Synthese zurückgeführt werden.

RNA Synthese durch RNA Polymerase III

In die Transkripte tRNA und 5S rRNA der RNA Polymerase III wurde in Gegenwart von Ovalicin ein geringerer Einbau von [^3H]Uridin beobachtet (Abb. 2, S. 78; Fig. 11, S. 79; Fig. 12, S. 83). Dies spricht für eine verminderte Syntheserate dieser Transkripte.

RNA Synthese durch RNA Polymerase II

In kleiner KernRNA (snRNA, siehe S. 75-86) ovalicinbehandelter Zellen wurden keine RNAs gefunden, deren Uridineinbau nach 60 - 90 min Pulsmarkierung nicht gehemmt war (Abb. 2, S. 78; Fig. 11, S. 79; Fig. 12, S. 83). Unter diesen kleinen RNAs sollten auch UsnRNAs markiert worden sein, die von RNA Polyme-

rase II synthetisiert werden (Gram-Jensen *et al.*, 1979; Busch *et al.*, 1982). Dieser Befund spricht damit für eine verminderte Syntheserate von RNA Polymerase II Transkripten.

Der Uridineinbau in fraktionierte KernRNA ovalicinbehandelter Zellen nach 60 min Pulsmarkierung mit [^3H]Uridin wurde zu 46% gehemmt (Fig. 27 & 28, S. 120 & 121). Da - in Mäuse-L Zellen - 58% der RNA Synthese auf hnRNA entfallen (Brandhorst & McConkey, 1974), die nicht von ribosomaler RNA abgetrennt wurde und als breiter Berg radioaktiven Hintergrundes mit erfaßt wurde, ist dies ebenfalls ein Hinweis auf die Hemmung der von RNA - Polymerase II katalysierten RNA Synthese.

RNA Synthese durch RNA Polymerase I

Die Synthese des von der RNA Polymerase I gebildeten 45S Primärtranskripts ribosomaler RNA kann mit der verwendeten Methode nicht genau gemessen werden, da Synthese und Abbau durch Prozessierung - und in ovalicinbehandelten Zellen wahrscheinlich auch unspezifischer Abbau (vgl. S. 145-146) - gleichzeitig auftreten und durch Pulsmarkierungen mit [^3H]Uridin nur die Differenz der im 45S Vorläufer verbliebenen Radioaktivität gemessen werden kann. Eine Reduzierung der 45S RNA Synthese ist jedoch wahrscheinlich, da erstens der Wachstumszustand einer Zelle streng mit der Synthese ribosomaler RNA korreliert (Barry & Gorski, 1971; Emerson, 1971; Luck & Hamilton, 1972; Yu & Feigelson, 1972; Grummt *et al.*, 1976; Grummt & Grummt, 1976; Grummt *et al.*, 1979; Soprano *et al.*, 1979; Buttgereit *et al.*, 1985) und zweitens der ebenfalls reduzierte Einbau von [^3H]Methylgruppen in ribosomale RNA nur mit einer Verringerung

des Substrats - des rRNA Vorläufermoleküls - erklärt werden kann.

Ovalicin hemmt damit offensichtlich die RNA Synthese aller drei eukaryotischen DNAabhängigen RNA Polymerasen, wenn auch nicht sehr stark, wie das bei direkten RNA Polymeraseinhibitoren, z.B. α -Amanitin, beobachtet wird.

Prozessieren ribosomaler RNA

Zwei Argumente sprechen dafür, daß ribosomale RNA in S49.1 - Zellen nach dem "Mäuse-L Zellweg" (Fig. 1, S. 8) prozessiert wird.

In KernRNA aus S49.1 Zellen (Abb. 1, S. 37) ist nach Auftrennung in einem Agarosegel und Anfärbung des Geles mit Ethidiumbromid eine Bande sichtbar, die 36S RNA zugeordnet werden kann. Eine Bande, die 20S RNA, dem Vorläufermolekül von 18S - RNA nach dem "HeLa Zellweg" (Fig. 2, S. 10) zugeordnet werden könnte, wurde dagegen nicht beobachtet.

18S RNA wird durch [methyl- ^3H]Methionin schon nach kurzer Zeit signifikant radioaktiv markiert (Fig. 6, S. 61). Ein 20S Vorläufer war in keinem Experiment deutlich markiert ²⁾.

Markiert man S49.1 Zellen 20 - 30 min mit [methyl- ^3H]Methionin und analysiert die eingebaute Radioaktivität in die einzelnen RNA Spezies (Fig. 5 & 6, S. 60 & 61; Fig. 7 & 8, S. 66 & 67), so ist das 45S Primärtranskript mit und ohne Ovalicinbehand-

²⁾ Jedoch wurde auch 36S RNA nie auffallend stark markiert

lung - bezogen auf die optische Dichte der isolierten KernRNA - etwa gleich stark markiert (S. 62; Tab. 9, S. 65). Dessen Methylierungsrate wird also durch die Droge nicht reduziert. Die Prozessierungsprodukte des Vorläufermoleküls im Zellkern sind jedoch nach 30 min und 40 min Markierung mit [methyl- ^3H]-Methionin in ovalicinbehandelten Zellen deutlich geringer markiert als in den entsprechenden Kontrollzellen (Fig. 7 & 8, S. 66 & 67; Fig. 9 & 10, S. 72 & 73). Zusätzlich wird in unbehandelten Kontrollzellen ein radioaktiver Gipfel beobachtet, welcher 41S RNA zugeordnet werden kann (Fig. 8, S. 67, Fig. 10, S. 73). In diesen Zellen besteht damit offensichtlich ein Gleichgewichtszustand zwischen Bildung und Abbau durch Prozessieren, der den Nachweis von steady state Konzentrationen dieser RNA erlaubt. 41S RNA ist in den entsprechenden Gelen ovalicinbehandelter Zellen nicht nachweisbar (Fig. 7, S. 66; Fig. 9, S. 72). Dies kann entweder dadurch verursacht sein, daß Ovalicin die Bildung von 41S RNA verlangsamt oder aber deren Abbau durch Prozessieren beschleunigt. Gegen die zweite Möglichkeit spricht jedoch die geringe radioaktive Markierung in allen weiteren Prozessierungsprodukten von 41S RNA (vgl. Fig. 1, S. 8) in ovalicinbehandelten Zellen. Wahrscheinlicher ist demnach, daß Ovalicin die Bildung von 41S RNA aus 45S RNA, also das Abtrennen des externen transkri-

bierten spacers an der Prozessierungsstelle Nr.1 ³⁾ verlangsam (Fig. 29).

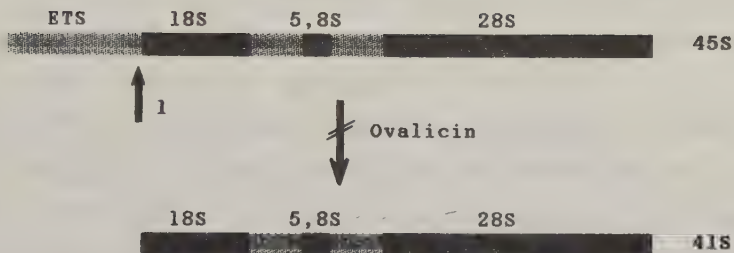


Fig. 29: Postulierte Hemmung des ersten nukleolytischen Prozessierungsschrittes von 45S- zu 41S RNA durch Ovalicin.

Die Prozessierungsprodukte von 45S RNA werden - mit Ausnahme von 18S RNA (Fußnote S. 63; Maden & Salim, 1974) - ausschließlich auf der Stufe der 45S RNA methyliert. Da sie auch in ovalicinbehandelten Zellen gering radioaktiv markiert sind,

³⁾ Dieser Schritt ist streng genommen nicht der erste endonukleolytische Schnitt des RNA Prozessierens in Mäusezellen. Noch vor diesem Schritt werden - wenn auch nicht vollständig - ca. 650 Nukleotide am 5' Ende des 45S Primärtranskripts unter Bildung einer 45S* RNA (Nomenklatur nach Fetherston *et al.*, 1984) abgetrennt (Kominami *et al.*, 1978; Urano *et al.*, 1980; Bach *et al.*, 1981; Grummt, 1981; Miller & Sollner-Webb, 1981; Fetherston *et al.*, 1984). 45S- und 45S* RNA können jedoch unter den angewandten Elektrophoresebedingungen nicht voneinander getrennt werden. Da dieses frühe Prozessierungsereignis in dieser Arbeit nicht experimentell erfaßt wird, wurde die "klassische" Numerierung der Prozessierungsschritte beibehalten.

zeigt, daß der erste Prozessierungsschritt durch Ovalicin nicht vollständig gehemmt wird. Dies spricht dafür, daß dieser Schritt nur indirekt von Ovalicin beeinflusst wird.

Die Möglichkeit des alternativen Prozessierens

Da Ovalicin offensichtlich den ersten Schritt des Prozessierens des 45S Vorläufers verlangsamt, könnte die zeitliche Abfolge der Prozessierungsschritte derart gestört werden, daß das Primärtranskript zuerst an anderen Prozessierungsstellen geschnitten wird. Dudov *et al.* postulierten 1978, daß 45S RNA in Leberzellen der Ratte teilweise auch an den Schnittstellen Nr. 2, 3 und 4 (Fig. 1, S. 8) ohne vorherige Abtrennung des externen transkribierten spacers (an Schnittstelle Nr. 1 zu 41S RNA) prozessiert werden kann. Die nach Schnitt Nr. 3 und 4 entstehenden RNAs und deren weitere Prozessierungsprodukte wurden von Bowman *et al.* (1981) in L Zellen der Maus und in menschlichen HeLa Zellen schließlich nachgewiesen (Fig. 30 & 31) und sollen hier als Diskussionsgrundlage dienen. Ein Prozessierungsweg, der mit einem Schnitt an Position Nr. 2 beginnt, wurde jedoch nicht gefunden. Da Bowman *et al.* (1981) annahmen, daß diese "neuen" alternativen Prozessierungswege für Säugetierzellen charakteristisch sind, muß für ovalicinbehandelte S49.1 Lymphomzellen der Maus diskutiert werden, ob nach Verlangsamung des Prozessierungsschrittes Nr. 1 das Ausweichen auf alternative Prozessierungswege möglich ist.

Beginnt das Prozessieren des Primärtranskriptes an der Schnittstelle Nr. 3 (Fig. 1, S. 8), entstehen aus 45S RNA eine 34S- und eine 32S RNA (Fig. 30). Aus 34S RNA entsteht über 20S RNA schließlich 18S RNA und aus 32S RNA auf dem "klassischen" Weg (Fig. 1, S. 8) 5,8S- und 28S RNA. Während diese beiden RNAs in Gegenwart von Ovalicin weiter aus 32S RNA entstehen könnten, wäre das weitere Prozessieren des 34S RNA Moleküls und dadurch die Bildung von 18S RNA durch Schnitt an Stelle Nr. 1 jedoch wahrscheinlich wieder verzögert.

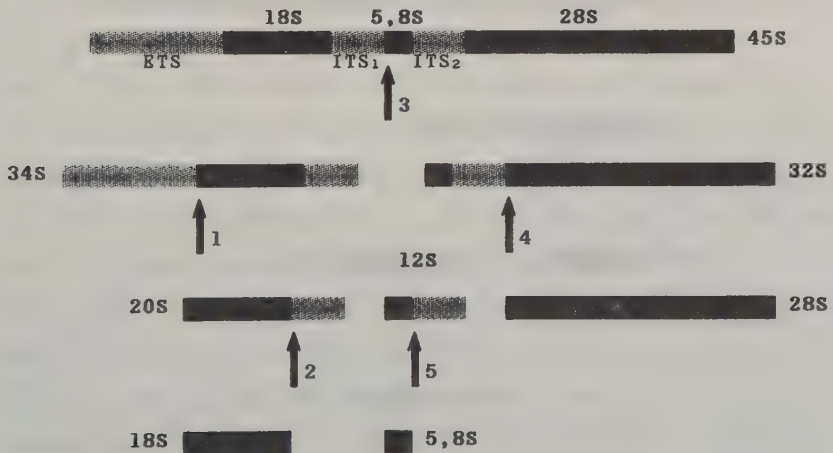


Fig. 30: Ein alternativer Prozessierungsweg für 45S preRNA. Gefunden in L Zellen der Maus und in menschlichen HeLa Zellen. Nach Bowman *et al.* (1981).

Beginnend mit dem Prozessierungsschritt Nr.4 entstehen aus dem 45S Primärtranskript eine 37S RNA und 28S RNA (Fig. 31). Aus 37S RNA entstehen über ein 26S Vorläufermolekül schließlich 5,8S- und 18S RNA. Ovalicin würde wahrscheinlich wiederum das weitere Prozessieren von 37S RNA an Stelle Nr. 1 verlangsamen und damit die Bildung von 18S- und 5,8S RNA hemmen.

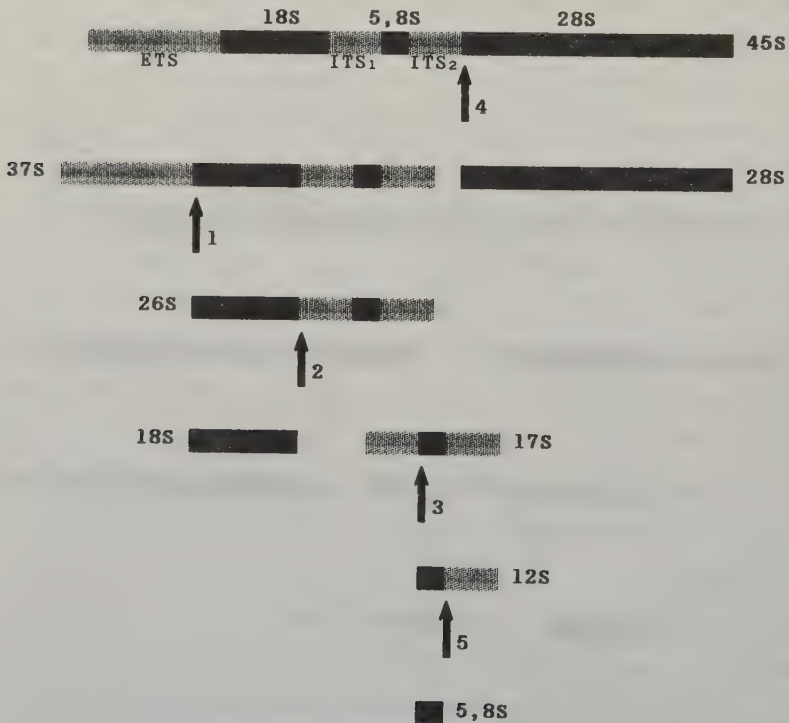


Fig. 31: Ein zweiter alternativer Prozessierungsweg für 45S preRNA. Gefunden in L Zellen der Maus und in menschlichen HeLa Zellen. Nach Bowman *et al.* (1981).

37S RNA ⁴⁾ akkumuliert nach Stoyanova & Hadjiolov (1979) im Nucleolus, wenn die Proteinbiosynthese durch Cycloheximid blockiert wurde. Dabei hemmt Cycloheximid in geringen Konzentrationen ebenfalls den endonukleolytischen Schnitt von 45S - RNA an der Position Nr.1 ⁵⁾. Die Anhäufung von 37S (39S) RNA zeigt damit, daß die Schnittstelle Nr. 1 - an der dieses Molekül ausschließlich prozessiert wird (Fig. 31) - im Falle einer Cycloheximidbehandlung in Leberzellen auch nach dem Ausweichen auf einen anderen Prozessierungsweg gehemmt bleibt.

Dies stützt die Annahme, daß der Prozessierungsschritt Nr. 1 auch in Gegenwart von Ovalicin weiter gehemmt bleibt. Er ist jedoch unumgänglich, da er - unabhängig von der zeitlichen Abfolge der übrigen Prozessierungsschritte - in jedem Fall zur Bildung des 5' Endes von 18S RNA nötig ist.

Für das Auftreten alternativer Prozessierungswege in S49.1 - Zellen, die Ovalicin ausgesetzt waren, wurde folgender Hinweis gefunden. Nach 60 min Pulsmarkierung mit [³H]Uridin wurden in KernRNA ovalicinbehandelter Zellen zwischen 36S- und 32S RNA zwei radioaktiv markierte Banden beobachtet (Fig. 27, S. 120). Dabei könnte es sich um 34S- und 32S RNA handeln, die durch das Prozessieren des 45S Primärtranskriptes an Position Nr. 3 (Fig. 30) entstehen. Im entsprechenden Kontrollversuch wird dagegen nur ein radioaktiver Gipfel - 32S RNA - beobachtet (Fig. 28, S. 121). Dagegen konnte mit der in dieser Arbeit angewandten Methode in ovalicinbehandelten S49.1 Zellen kein

⁴⁾ dort 39S RNA genannt, siehe auch Dabeva & Dudov, 1982

⁵⁾ die weitere Störung des Prozessierens unterscheidet sich jedoch von der Wirkung von Ovalicin; Ovalicin ist auch kein Inhibitor der Proteinbiosynthese (Hartmann *et al.*, 1978)

Hinweis für das Auftreten des zweiten, von Bowman *et al.* (1981) beschriebenen alternativen Prozessierungsweg (Fig. 31) gefunden werden.

Diese Fragen müßten bei Fortführung der Arbeit mit Hybridisierungstechniken (Bowman *et al.*, 1981, Bowman *et al.*, 1983; Fetherston *et al.*, 1984) beantwortet werden. Diese sind empfindlicher im Nachweis gering vorkommender RNAs und erlauben durch die Wahl geeigneter Proben auch deren eindeutige Identifizierung.

Die Anhäufung ribosomaler RNA im Zellkern

Beobachtet man nach kürzeren Markierungszeiten mit [^3H]Methionin (20 - 40 min) noch eine geringere Markierung der Prozessierungsprodukte des 45S RNA Vorläufermoleküls in ovalicinbehandelten S49.1 Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen, so kehrt sich die Situation nach längeren Markierungszeiten (60 - 90 min) in das Gegenteil um. Während das 45S Primärtranskript mit und ohne Ovalicin nach wie vor annähernd gleich stark markiert wird, sind die Prozessierungsprodukte 32S-, 28S- und 18S RNA ovalicinbehandelter Zellen signifikant stärker markiert als in Kontrollzellen (Fig. 13 & 14, S. 88 & 89; Fig. 18 & 19, S. 98 & 99; Tab. 13, S. 90) und scheinen sich im Zellkern anzuhäufen.

Am auffälligsten ist die Anhäufung von 28S RNA im Zellkern ovalicinbehandelter Zellen (Fig. 13; Fig. 18), die in RNA aus

Kontrollzellen jeweils nur gering markiert ist (Fig. 14; Fig. 19). Auch 32S RNA, der direkte Vorläufer von 28S RNA (Fig. 1, S. 8) ist angehäuft.

Eine solche Anhäufung diskutiert Hadjiolov (1985, S. 154) als eine Möglichkeit des Schicksals "abnormaler" preRNAs. Da diese RNA Spezies im Zellkern nicht in freier Form, sondern bereits als Vorläufer ribosomaler Untereinheiten mit Proteinen verpackt (Warner & Soeiro, 1967; Bachellerie *et al.*, 1975; Wunderlich, 1981; Sommerville, 1985), vorliegen, erklärt dies ihren Schutz vor dem Abbau durch Nukleasen. Im Gegensatz dazu ist dieser Schutz für das 45S Primärtranskript mit seinen nicht funktionalen Spacersequenzen nicht unbedingt zu erwarten.

Diese Anhäufung prozessierter [^3H]methylmarkierter 32S-, 28S- und 18S RNA erklärt auch, warum der Einbau von [^3H]Methylgruppen in GesamtkernRNA ovalicinbehandelter Zellen nach längeren Markierungszeiten mit [methyl- ^3H]Methionin anscheinend nicht mehr in dem Maße reduziert ist wie nach kürzeren Markierungszeiten (Tab. 5, S. 53).

Sie ist weiter eine Erklärung für die geringen Unterschiede im Gesamt RNA Gehalt der Zellkerne in ovalicinbehandelten und unbehandelten Zellen (Tab. 2, S. 48).

Verzögerter Transport von 28S RNA in das Cytoplasma

Markiert man S49.1 Zellen kürzere Zeit (30 - 40 min mit [me-

thyl- ^3H]Methionin, so findet man im Cytoplasma der Zellen - neben tRNA - unabhängig von der Gegenwart von Ovalicin nur radioaktiv markierte 18S rRNA, jedoch keine markierte 28S RNA (ohne Beleg). Das stimmt mit der lange bekannten Tatsache überein, daß die kleine ribosomale Untereinheit (mit 18S rRNA) schneller in das Cytoplasma transportiert wird als die große Untereinheit (mit 28S rRNA; Penman, 1966; Penman *et al.*, 1966; Weinberg *et al.*, 1967; Attardi & Amaldi, 1970, S. 202). Dies wird im allgemeinen damit erklärt, daß die Umwandlung von 32S- zu 28S RNA (Fig. 1, S. 8) den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des Prozessierens darstellt (Perry, 1976; Wolf & Schlessinger, 1977; Wunderlich, 1981; Hadjiolova *et al.*, 1984b; Hadjiolov, 1985, S. 155).

Markiert man die Zellen längere Zeit (60 oder 90 min) mit [methyl- ^3H]Methionin bzw. [^3H]Uridin, erscheint auch radioaktiv markierte 28S rRNA im Cytoplasma (Fig. 16 & 17, S. 94 & 95; Fig. 20 & 21, S. 102 - 103; Fig. 22 & 23, S. 106 - 107; Fig. 24, S. 111; Abb. 3, S. 109). Jedoch ist das Verhältnis der eingebauten Radioaktivität von 18S rRNA zu 28S rRNA im Cytoplasma der Zellen, die Ovalicin ausgesetzt waren, stets doppelt so hoch wie das entsprechende Verhältnis in unbehandelten Kontrollzellen (Fig. 20 & 21; Fig. 22 & 23; Fig. 24; Tab. 14, S. 101; Tab. 15, S. 105; Tab. 16, S. 110; Abb. 3, S. 109). Dieses Verhältnis wurde sowohl nach [^3H]Methioninmarkierung (Fig. 20 & 21) als auch nach [^3H]Uridinmarkierung (Fig. 22 & 23; Fig. 24), also unabhängig von der Methylierung beobachtet. Das bedeutet, daß 28S RNA in Gegenwart von Ovalicin langsamer

in das Cytoplasma transportiert wird als 18S RNA und erklärt damit die auffällige Anhäufung von 28S RNA im Zellkern.

Im Zellkern häuft sich in Gegenwart von Ovalicin auch 18S RNA an (Fig. 13, S. 88; Fig. 18, S. 98). Um festzustellen, ob auch 18S RNA durch Ovalicin verzögert in das Cytoplasma transportiert wird, ist es notwendig, deren spezifische Radioaktivität mit und ohne Ovalicin zu vergleichen. Es standen jedoch keine Geräte zur Verfügung, welche die Bestimmung der optischen Dichte der einzelnen RNA Banden in den Gelen erlaubt hätte (vgl. Loening, 1968; Dudov *et al.*, 1976). Da sich zudem herausstellte, daß die Ethanol-fällungen cytoplasmatischer RNA nicht quantitativ ausfielen (S. 31, S. 93, S. 100, S. 104), sind auch keine verlässlichen Angaben über die Mengen an RNA möglich, die jeweils auf die Gele aufgesetzt wurden.

So konnte ein verzögerter Transport in das Cytoplasma nur für 28S RNA, d. h. die große ribosomale Untereinheit im Vergleich zu 18S RNA, nachgewiesen werden.

Methylierung ribosomaler RNA

Im Gegensatz zu Pulsmarkierungsexperimenten mit [methyl- ^3H]Methionin haben die entsprechenden Experimente mit [^3H]Uridinmarkierung den Nachteil, daß alle RNA Spezies radioaktiv markiert werden. Dies hat zur Folge, daß in fraktionierter RNA zusätzlich radioaktiv markierte Gipfel auftreten, die oft nicht zweifelsfrei zugeordnet werden können und dadurch die Analyse erschweren. Sie können entweder von diskreten hnRNA -

Spezies - die in den Experimenten nicht abgetrennt wurden - oder von abgetrennten Spacersequenzen ribosomaler RNA stammen.

Nach einer 30 min Pulsmarkierung von S49.1 Zellen mit [^3H]Uridin wurde die eingebaute Radioaktivität auf die einzelnen RNA Spezies in unbehandelten Kontrollzellen (Fig. 26, S. 117) in etwa so verteilt, wie es auch nach einer entsprechend langen Markierung mit [^3H]Methionin beobachtet wurde (Fig. 8, S. 67; Fig. 10, S. 73). Der Hauptanteil der Radioaktivität wurde jeweils in 45S RNA gefunden.

Im Gegensatz dazu war in Zellen, die mit Ovalicin behandelt wurden, nach Markierung mit [^3H]Uridin nicht das 45S Primärtranskript am höchsten radioaktiv markiert, sondern mehrere RNA Spezies im Bereich zwischen 36S- und 24S RNA (Fig. 25, S. 116). Die Markierung mit [^3H]Uridin führte also im Vergleich mit der entsprechenden Markierung mit [methyl- ^3H]Methionin (Fig. 7, S. 66) nur in Gegenwart von Ovalicin zu einer veränderten Verteilung der eingebauten Radioaktivität.

Die radioaktiven Gipfel "sitzen" zwar nun gleichermaßen auf einem "Berg" von - ebenfalls radioaktiv markierter - hnRNA. Ovalicin reduziert jedoch bestimmt nicht spezifisch die Transkription von hnRNA eines bestimmten Längenbereiches. Damit dürfte das Profil des radioaktiven hnRNA "Berges" mit und ohne Ovalicin - abgesehen von dessen Höhe - gleich sein und ist damit keine Erklärung für die beobachteten Intensitätsunterschiede.

Die geringere Markierung von 45S RNA mit [^3H]Uridin könnte mit einer Beschleunigung ihres Prozessierens durch Ovalicin er-

klärt werden. Dagegen spricht jedoch, daß nach Markierung der Zellen mit [methyl- ^3H]Methionin - wodurch fast ausschließlich ribosomale RNA radioaktiv markiert wird (Greenberg & Penman, 1966; Maden & Salim, 1974) - genau das Gegenteil beobachtet wurde.

Der Einbau von [^3H]Uridin in 45S RNA könnte durch Ovalicin stark gehemmt sein. Dies ist jedoch unwahrscheinlich, da sich zwei der am höchsten radioaktiv markierten Gipfel (Fig. 25, S. 116) 32S- und 28S RNA zuordnen lassen. Diese werden aus 45S RNA herausgeschnitten (Fig. 1, S. 8) und daher nur auf der Stufe dieser RNA radioaktiv markiert. 45S RNA muß also radioaktiv markiert worden sein.

Daß die spezifische Radioaktivität von [^3H]UTP während der 30 min Markierungsdauer durch Ovalicin drastisch reduziert wurde, ist ebenfalls unwahrscheinlich, denn auch nach einer 60 min Markierung der Zellen mit [^3H]Uridin ist das 45S Primärtranskript in Gegenwart von Ovalicin radioaktiv markiert (Fig. 27, S. 120).

Ein Abbau der - aufgrund ihrer Länge - besonders RNaseempfindlichen 45S RNA während der Probenaufbereitung ist unwahrscheinlich, da sich das Ergebnis reproduzieren ließ (S. 115). Auch eine 60 min Markierung der Zellen mit [^3H]Uridin zeigte noch diese Intensitätsunterschiede abhängig von der Gegenwart von Ovalicin (Fig. 27 & 28, S. 120 & 121).

Hadjilov (1985, S. 154) diskutiert die Möglichkeit des unspezifischen Abbaus einer RNA, die nicht prozessiert werden kann. Daß VorläuferRNAs, deren Prozessierung durch den Ausfall des verantwortlichen Enzyms verhindert ist, nicht stabil sind und

abgebaut werden, wurde vor kurzem - allerdings nur in *E. coli* - von Tomcsányi & Apirion (1985) gezeigt. Jedoch sollten auch in den Kernen eukaryotischer Zellen unspezifische Nukleasen für den Abbau von Intron- oder Spacersequenzen vorhanden sein. So beschrieben Eichler & Eales 1982 das Vorkommen einer pankreasähnlichen Ribonuklease aus den Nucleoli von Ehrlich Ascites Tumorzellen. Daher könnte in S49.1 Zellen, die mit Ovalicin behandelt wurden, nach der Verlangsamung des ersten Prozessierungsschrittes die unspezifische Hydrolyse des 45S RNA - Moleküls zum Zuge kommen. Diese Möglichkeit erklärt jedoch alleine auch nicht den geringeren Einbau von [^3H]Uridin in 45S RNA, denn auch in einer [^3H]methylmarkierten 45S RNA müsste dieser Abbau durch einen vergleichbaren Verlust an Radioaktivität erkennbar sein ⁶⁾.

Keine der genannten Möglichkeiten kann also die Unterschiede im Einbau der radioaktiven Vorstufen befriedigend erklären.

Verändertes Methylierungsmuster durch Ovalicin

Die kurzzeitige radioaktive Markierung von KernRNA mit [^3H]Methylgruppen liefert in Zellen, die mit Ovalicin behandelt wurden (Fig. 7, S. 66; Fig. 9, S. 72) ein anderes Verteilungsmuster der eingebauten Radioaktivität als die entsprechende Mar-

⁶⁾ Man könnte zwar argumentieren, daß ein unspezifischer Abbau des 45S RNA Moleküls vor allem die nicht funktionalen und nicht methylierten (!) Spacerregionen betreffen würde und dadurch keine Markierung verloren ginge. Ein solches Molekül würde jedoch nicht mehr an der gleichen Stelle im Gel wandern wie intakte 45S RNA

kierung mit [^3H]Uridin (Fig. 25, S. 116). Im Gegensatz dazu stehen die entsprechenden Kontrollversuche nicht miteinander im Widerspruch (Fig. 26, S. 117 im Vergleich mit Fig. 8, S. 67 und Fig. 10, S. 73). Daher ist es nicht abwegig, in der Wirkung des Ovalicins selbst die Erklärung für diese Unterschiede zu suchen.

Eine solche Erklärung liefert die Hypothese, daß Ovalicin das Methylierungsmuster des 45S Primärtranskriptes verändert. Damit könnten auch Spacersequenzen methyliert werden, die normalerweise nicht methyliert sind (Maden *et al.*, 1977). Genaue Aussagen über die Veränderung des Methylierungsmuster können jedoch aufgrund der durchgeführten Experimente nicht gemacht werden. Die Vielzahl unbekannter und nicht eindeutig definierter Banden nach Markierung mit [^3H]Uridin (Fig. 25 & 26, S. 116 & 117; Fig. 27 & 28, S. 120 & 121) sowie der unterschiedlich hohe Zählhintergrund nach Einbau der beiden Vorstufen gestatten keine schlüssigen Aussagen.

Mehrere Arbeitsgruppen beschrieben bisher eine Untermethylierung des 45S Primärtranskriptes, sei es durch Entzug einer essentiellen Aminosäure (Vaughan *et al.*, 1967; Grummt, 1977) oder durch spezifische Inhibitoren wie Cycloleucin ⁷⁾ (Caboche & Bachellerie, 1977). Diese Untermethylierung bewirkt eine generelle Verlangsamung der Ribosomensynthese (Wolf & Schlessinger, 1977).

Nach Behandlung von S49.1 Zellen mit Ovalicin ist jedoch die Methylierung der 45S RNA - bezogen auf die optische Dichte der

⁷⁾ ein Inhibitor der ATP:L-Methionin-S-adenosyltransferase

isolierten GesamtkernRNA - gegenüber Kontrollzellen nicht reduziert (Fig. 5 & 6, S. 60 & 61; Tab. 10, S. 68).

Untermethylierte 45S RNA könnte zwar in Gegenwart von Ovalicin angehäuft worden sein und daher zu einem vergleichbar hohen radioaktiven Gipfel führen. Dem widerspricht jedoch die geringe Markierung von 45S RNA bei entsprechender [^3H]Uridinmarkierung.

Die Untermethylierung der ribosomalen RNA Vorläufer blockiert deren Prozessieren nicht an einer definierten Stelle und verlangsamt den Transport von 28S- und 18S rRNA in das Cytoplasma gleich stark (Caboche & Bachellerie, 1977; Grummt, 1977).

Ovalicin ändert jedoch das Prozessierungsmuster (S. 59 - 74) und verlangsamt das Erscheinen von 28S rRNA im Cytoplasma gegenüber 18S rRNA (S. 87 - 111). Damit ist eine reine Untermethylierung als Erklärung der Wirkungsweise von Ovalicin unwahrscheinlich.

Ovalicin muß das Methylierungsmuster von 45S rRNA auf eine komplexere - möglicherweise unspezifische - Art und Weise verändern. Dies wäre durch eine Erniedrigung der Spezifität der verantwortlichen Methylase(n) im Nucleolus denkbar. Dadurch könnte,

- ① durch sterische Hinderung oder

- ② durch Konformationsänderungen einzelsträngiger RNA
(siehe Rottman *et al.*, 1974; Maden *et al.*, 1977)

- ③ oder durch Änderung der korrekten Sekundärstruktur

die Anlagerung derjenigen Proteine an die Vorläufer ribosomaler RNA im Nucleolus behindert werden, die für das korrekte

Abtrennen des externen transkribierten spacers verantwortlich sind und damit den Befund 2.) (S. 1) erklären. Daß die fehlende Verfügbarkeit von kritischen Proteinen tatsächlich die Wahrscheinlichkeit endonukleolytischer Schnitte in der rRNA - Reifung von Rattenleberzellen drastisch ändern kann, zeigten die Experimente von Stoyanova & Hadjiolov (1979) mit Cycloheximid, einem Inhibitor der Proteinbiosynthese.

Die erniedrigte Spezifität einer oder mehrerer Methylasen könnte zu 45S Molekülen führen, die individuell unterschiedlich methyliert sind und dadurch unterschiedlich schnell prozessiert werden könnten. Dies würde erklären, warum Ovalicin den ersten Prozessierungsschritt nicht vollständig hemmt (S. 135-136).

Die gestörte Anlagerung von Proteinen durch eine Veränderung des Methylierungsmusters kann ebenfalls den Befund 3.) (S. 1) von Ovalicin erklären: die beobachtete Anhäufung von 28S- und 18S RNA im Zellkern (S. 87 - 111). Die Störung der Anlagerung von Proteinen kann zur Bildung unvollständiger oder fehlerhafter Preribosomen führen, die nicht oder nur verlangsamt in das Cytoplasma transportiert werden können und sich daher im Zellkern anhäufen.

Und schließlich ist das veränderte Methylierungsmuster möglicherweise auch die Ursache für den verzögerten Transport von 28S RNA gegenüber 18S RNA in das Cytoplasma (S. 87 - 111).

Dieser Effekt wurde bereits früher bei der Untersuchung der Proteinsyntheseinhibitoren Cycloheximid und Puromycin beschrieben (Soeiro *et al.*, 1968; Willems *et al.*, 1969; Lönn & Edström, 1977). Der Transport der ribosomalen Untereinheiten

in das Cytoplasma wird gehemmt, jedoch ist der Transport der großen Untereinheit (mit 28S rRNA) stets stärker verlangsamt als der Transport der kleinen Untereinheit (mit 18S rRNA). Die Blockierung der Proteinsynthese durch Cycloheximid oder Puromycin ändert jedoch nicht das Methylierungsmuster ribosomaler pre RNA (Hadjiolov, 1980, S. 53). Der Effekt wurde ebenfalls bei Entzug der Aminosäure Valin beobachtet (Vaughan *et al.*, 1967; Maden *et al.*, 1969). In einer Arbeit von Kumar & Wu (1973) wurde dieser Effekt - nach Hemmung der RNA Synthese mit dem Alkaloid Camptothecin - ebenfalls beschrieben.

Neuere Arbeiten von Hadjiolova *et al.* (1984a) zeigten, daß 28S rRNA im Nucleolus am 5' Ende bis zu 60 Nukleotide länger ist als die reife, cytoplasmatische Form. Das bedeutet, daß der Prozessierungsschritt, der das reife 5' Ende von 28S rRNA bildet, erst im Cytoplasma stattfindet (siehe auch Kominami *et al.*, 1978).

Es ist weiter bekannt, daß manche Proteine während der Ribosomensynthese erst spät angelagert werden und die Anlagerung von Proteinen möglicherweise den Transport in das Cytoplasma steuert (Hadjiolov, 1985, S. 155-156; Sommerville, 1985).

Wäre der Transport der großen ribosomalen Untereinheit (mit 28S rRNA) durch Bindung der zusätzlichen Sequenzen am 5' Ende von nuklearer 28S RNA an ein Transportprotein (Sommerville, 1985) oder Bindung an die Kernmatrix - die zu über 96% aus Proteinen besteht (Wunderlich, 1981) - gesteuert, könnte damit der verzögerte Transport von 28S RNA in das Cytoplasma in Gegenwart von Ovalicin erklärt werden. Durch das veränderte Me-

thylierungsmuster könnten diese Wechselwirkungen behindert und dadurch der Transport verlangsamt werden.

Ovalicin als Immunsuppressivum

Ovalicin hemmt in S49.1 Zellen durch Störung des Prozessierens ribosomaler RNA und durch den verzögerten Transport von 28S - RNA in das Cytoplasma die Neusynthese von Ribosomen, die zur Teilung der Zellen notwendig sind, um u. a. die Synthese der Proteine zum Verpacken der neu zu synthetisierenden DNA zu gewährleisten. S49.1 Zellen besitzen - als proliferierende Tumorzellen - einen relativ hohen Gehalt an Ribosomen, der sie zu rascher Zellteilung befähigt. Dies erklärt die langsame Wirkung der Droge auf das Wachstum dieser Zellen in Zellkultur (Fig. 4, S. 46). Erst nach ca. 40 h Einwirkung der Droge in einer Konzentration von $2 \cdot 10^{-7} M$ läßt sich eine Hemmung des Wachstums durch Ovalicin nachweisen, d. h. die Zellen können sich in Gegenwart der Droge noch zwei- bis dreimal teilen, bis sie offenbar einen kritischen Ribosomengehalt unterschritten haben, der ihnen keine weitere Zellteilung ermöglicht. Da in ovalicinbehandelten S49.1 Zellen nach Ablauf eines Zellzyklus (von ca. 24 h) 75% des Ribosomengehaltes unbehandelter Kontrollzellen gemessen wurde (Diersch, 1982), läge dieser kritische Ribosomengehalt nach diesen Überlegungen zwischen 56% ($0,75 \cdot 0,75 \cdot 100$) und 42% ($0,75 \cdot 0,75 \cdot 0,75 \cdot 100$). Grummt *et al.* zeigten 1979, daß Zellen mit zu geringem Ribosomengehalt nicht reversibel an einem bestimmten Punkt des Zellzyklus verharren,

sondern dann auch tatsächlich - zu einem zufälligen Zeitpunkt - sterben.

Dieser Mechanismus alleine erklärt jedoch noch nicht die spezifische Wirkung von Ovalicin - als Immunsuppressivum - auf die Zellen des Immunsystems (Lazáry & Stähelin, (1968); Hartmann *et al.*, 1978; Zimmermann & Hartmann, 1981). Um diese zu verstehen ist zu bemerken, daß Immunsuppressiva ruhende Lymphocyten an der Proliferation im Organismus hindern und proliferierende Tumorzellen somit nur ein - aus mehreren Gründen vorteilhaftes - Modellsystem darstellen. Ruhende Lymphocyten und aus Lymphocyten hervorgegangene Tumorzellen (Lymphomzellen) unterscheiden sich jedoch noch in vielfältiger Weise. Entscheidend für das Verständnis der immunsuppressiven Wirkung ist die Tatsache, daß in ruhenden Lymphocyten nur bis zu einem Zehntel des Ribosomengehaltes vorliegt, der in stimulierten Lymphocyten gemessen wird (Kay *et al.*, 1969; Cooper & Gibson, 1971; Emerson, 1971; Sören & Biberfeld, 1973). Stimulierte Lymphocyten müssen daher erst mit der Synthese neuer Ribosomen beginnen, wenn sie sich teilen wollen. Dadurch wirkt sich die Hemmung durch Ovalicin auf die Bildung reifer rRNA dort wohl viel stärker aus. Möglicherweise erreichen diese Zellen überhaupt nicht den Gehalt an Ribosomen, der sie zu einer Zellteilung befähigen würde.

LITERATUR

- Attardi, G. & Amaldi, F. (1970) Structure and synthesis of ribosomal RNA. *Annu. Rev. Biochem.* 39, 183-226.
- Auger, M.-A., Tiollais, P. & Charbonnier, M. (1974) 5-S RNA: biosynthesis and association to immature ribosomal particles in the nucleus of lymphocytic mouse leukemia cells, L5178 Y. *Eur. J. Biochem.* 48, 157-165.
- Bach, R., Grummt, I. & Allet, B. (1981) The nucleotide sequence of the initiation region of the ribosomal transcription unit from mouse. *Nucleic Acids Res.* 9, 1559-1569.
- Bachelierie, J.-P., Nicoloso, M. & Zalta, J.-P. (1975) Early nucleolar preribosomal RNA · protein in mammalian cells. *Eur. J. Biochem.* 55, 119-129.
- Bachelierie, J.-P., Michot, B. & Raynal, F. (1983) Recognition signals for mouse pre-rRNA processing. *Mol. Biol. Rep.* 9, 79-86.
- Barry, J. & Gorski, J. (1971) Uterine ribonucleic acid polymerase. Effect of Estrogen on nucleotide incorporation into 3'Chain Termini. *Biochemistry* 10, 2384-2390.
- Berger, S. L. & Birkenmeier, C. S. (1979) Inhibition of intractable nucleases with ribonucleoside-vanadyl complexes: isolation of messenger ribonucleic acid from resting lymphocytes. *Biochemistry* 18, 5143-5149.
- Bergmeyer, H. U. (1977) Grundlagen der enzymatischen Analyse. pp. 234 - 236, Verlag Chemie, Weinheim, New York.
- Birch, A. J. & Hussain, S. F. (1969) Studies in relation to biogenesis. Part XXXVIII. A preliminary study of Fumagillin. *J. Chem. Soc. C*: 1969 (2), 1473-1474.
- Bollinger, P., Sigg, H.-P. & Weber, H.-P. (1973) Die Struktur von Ovalicin. *Helv. Chim. Acta* 56, 819-830.
- Borun, T. W., Scharff, M. D. & Robbins, E. (1967) Preparation of mammalian polyribosomes with the detergent Nonidet P-40. *Biochim. Biophys. Acta* 149, 302-304.
- Bowman, L. H., Goldman, W. E., Goldberg, G. I., Hebert, M. B. & Schlessinger, D. (1983) Location of the initial cleavage sites in mouse pre-rRNA. *Mol. Cell. Biol.* 3, 1501-1510.

- Bowman, L. H., Rabin, B. & Schlessinger, D. (1981) Multiple ribosomal RNA cleavage pathways in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 9, 4951-4966.
- Brandhorst, B. P. & McConkey, E. H. (1974) Stability of nuclear RNA in mammalian cells. *J. Mol. Biol.* 85, 451-463.
- Busch, H., Reddy, R., Rothblum, L. & Choi, Y. C. (1982) SnRNAs, snRNPs, and RNA processing. *Annu. Rev. Biochem.* 51, 617-654.
- Buttgereit, D., Pflugfelder, G. & Grummt, I. (1985) Growth-dependent regulation of rRNA synthesis is mediated by a transcription initiating factor (TIF-IA). *Nucleic Acids Res.* 13, 8165-8180.
- Caboche, M. & Bachellerie, J.-P. (1977) RNA Methylation and control of eukaryotic RNA biosynthesis. Effects of Cycloleucine, a specific inhibitor of methylation, on ribosomal RNA maturation. *Eur. J. Biochem.* 74, 19-29.
- Cane, D. E. & Buchwald, S. L. (1977) Application of deuterium magnetic resonance to biosynthetic studies. I. Biosynthesis of Ovalicin. *J. Am. Chem. Soc.* 99, 6132-6134.
- Cane, D. E. & King, G. G. S. (1976) The biosynthesis of Ovalicin: isolation of β -*trans*-Bergamotene. *Tetrahedron Lett.* 1976 (51), 4737-4740.
- Cane, D. E. & Levin, R. H. (1975) Application of carbon-13 magnetic resonance to isoprenoid biosynthesis. I. Ovalicin. *J. Am. Chem. Soc.* 97, 1282-1284.
- Cane, D. E. & Levin, R. H. (1976) Application of carbon-13 magnetic resonance to isoprenoid biosynthesis. II. Ovalicin and the use of doubly labeled mevalonate. *J. Am. Chem. Soc.* 98, 1183-1188.
- Chen-Kiang, S., Nevins, J. R. & Darnell Jr, J. E. (1979) N⁶-methyl-adenosin in adenovirus type 2 nuclear RNA is conserved in the formation of messenger RNA. *J. Mol. Biol.* 135, 733-752.
- Chirgwin, J. M., Przybyla, A. E., MacDonald, R. J. & Rutter, W. J. (1979) Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18, 5294-5299.
- Cooper, H. L. & Braverman, R. (1977) The mechanism by which Actinomycin D inhibits protein synthesis in animal cells. *Nature (London)* 269, 527-529.

- Cooper, H. L. & Gibson, E. M. (1971) Control of synthesis and wastage of ribosomal ribonucleic acid in lymphocytes. II. The role of protein synthesis. *J. Biol. Chem.* 246, 5059-5066.
- Corey, E. J. & Dittami, J. P. (1985) Total synthesis of ($\pm$)-Ovalicin. *J. Am. Chem. Soc.* 107, 256-257.
- Cory, S. & Adams, J. M. (1977) A very large repeating unit of mouse DNA containing the 18S, 28S and 5,8S rRNA genes. *Cell* 11, 795-805.
- Dabeva, M. D. & Dudov, K. P. (1982) Quantitative alterations in the nucleolar and nucleoplasmic ribosomal ribonucleic acids in regenerating rat liver. *Biochem. J.* 204, 179-183.
- Dabeva, M. D., Dudov, K. P., Hadjiolov A. A., Emanuilov, I. & Todorov, B. N. (1976) Intranuclear maturation pathways of rat liver ribosomal ribonucleic acids. *Biochem. J.* 160, 495-503.
- Dabeva, M. D., Dudov, K. P., Hadjiolov, A. A. & Stoykova, A. S. (1978) Quantitative analysis of rat liver nucleolar and nucleoplasmic ribosomal ribonucleic acids. *Biochem. J.* 171, 367-374.
- Diersch, H. (1982) Einfluß des Sesquiterpens Ovalicin auf den Ribosomengehalt von S49.1-Lymphomazellen. Diplomarbeit, Fakultät für Chemie und Pharmazie, Ludwig Maximilians-Universität München.
- Dudov, K. P. & Dabeva, M. D. (1983) Post-transcriptional regulation of ribosome formation in the nucleus of regenerating rat liver. *Biochem. J.* 210, 183-192.
- Dudov, K. P., Dabeva, M. D. & Hadjiolov, A. A. (1976) Simple agar-urea-gel electrophoretic fractionation of high molecular weight ribonucleic acids. *Anal. Biochemistry* 76, 250-258.
- Dudov, K. P., Dabeva, M. D., Hadjiolov, A. A. & Todorov, B. N. (1978) Processing and migration of ribosomal ribonucleic acids in the nucleolus and nucleoplasm of rat liver nuclei. *Biochem. J.* 171, 375-383.
- Dudov, K. P., Hadjiolova, K. V., Kermekchiev, M. B., Stanchev, B. S. & Hadjiolov, A. A. (1983) A 12S precursor to 5,8S rRNA associated with rat liver nucleolar 28S rRNA. *Biochim. Biophys. Acta* 739, 79-84.
- Eichler, D. C. & Kales, S. J. (1982) Isolation and characterization of a single-stranded specific endoribonuclease from Ehrlich cell nucleoli. *J. Biol. Chem.* 257, 14384-14389.

- Emerson Jr, C. P. (1971) Regulation of the synthesis and the stability of ribosomal RNA during contact inhibition of growth. *Nature (London), New Biol.* 232, 101-106.
- Fetherston, J., Werner, E. & Patterson, R. (1984) Processing of the external transcribed spacer of murine rRNA and site of action of actinomycin D. *Nucleic Acids Res.* 12, 7187-7198.
- Goldman, W. E., Goldberg, G., Bowman, L. H., Steinmetz, D. & Schlessinger, D. (1983) Mouse rDNA: sequences and evolutionary analysis of space and mature RNA regions. *Mol. Cell Biol.* 3, 1488-1500.
- Gram Jensen, E., Hellung-Larsen, P. & Frederiksen, S. (1979) Synthesis of low molecular weight RNA components A,C and D by polymerase II in α -amanitinresistant hamster cells. *Nucleic Acids Res.* 6, 321-330.
- Greenberg, H. & Penman, S. (1966) Methylation and processing of ribosomal RNA in HeLa cells. *J. Mol. Biol.* 21, 527-535.
- Grummt, F., Grummt, I. & Mayer, E. (1979) Ribosome biosynthesis is not necessary for initiation of DNA replication. *Eur. J. Biochem.* 97, 37-42.
- Grummt, I. (1977) The effects of histidine starvation on the methylation of ribosomal RNA. *Eur. J. Biochem.* 79, 133-141.
- Grummt, I. (1981) Mapping of a mouse ribosomal DNA promotor by *in vitro* transcription. *Nucleic Acids Res.* 9, 6093-6102.
- Grummt, I. & Grummt, F. (1976) Control of nucleolar RNA synthesis by the intracellular pool sizes of ATP and GTP. *Cell* 7, 447-453.
- Grummt, I., Smith, V. A. & Grummt, F. (1976) Amino acid starvation affects the initiation frequency of nucleolar RNA polymerase. *Cell* 7, 439-445.
- Gurney Jr, T. (1984) One-dimensional electrophoresis of nucleic acids in agarose using denaturation with formaldehyde and identification of ^3H -labeled RNA by fluorography. In *Methods in Molecular Biology* (Walker, J., ed.), vol. 2, pp. 77 - 92, Humana Press, Clifton, New Jersey.
- Hadjiolov, A. A. & Nikolaev, N. (1976) Maturation of ribosomal ribonucleic acids and the biogenesis of ribosomes. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 31, 95-144.

- Hadjiolov, A. A. (1980) Biogenesis of ribosomes in eukaryotes. In Subcellular Biochemistry (Roodyn, D. B., ed.), vol. 7, pp. 1 - 80, Plenum Press, New York.
- Hadjiolov, A. A. (1985) The nucleolus and ribosome biogenesis. Cell Biology Monographs, Vol. 12, Springer-Verlag, Wien, New York.
- Hadjiolova, K. V., Georgiev, O. I. & Hadjiolov, A. A. (1984a) Excess 5' terminal sequences in the rat nucleolar 28S ribosomal RNA. *Exp. Cell Res.* 153, 266-269.
- Hadjiolova, K. V., Georgiev, O. I., Nosikov, V. V. & Hadjiolov, A. A. (1984b) Localization and structure of endonuclease cleavage sites involved in the processing of the rat 32S precursor to ribosomal RNA. *Biochem. J.* 220, 105-116.
- Hartmann, G. R., Richter, H., Weiner, E. M. & Zimmermann, W. (1978) On the mechanism of action of the cytostatic drug Anguidine and of the immunosuppressive agent Ovalicin, two sesquiterpenes from fungi. *Planta med.* 34, 231-252.
- Hassouna, N., Michot, B. & Bachellerie, J.-P. (1984) The complete nucleotide sequence of mouse 28S rRNA gene. Implications for the process of size increase of the large subunit rRNA in higher eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* 12, 3563-3583.
- Horibata, K. & Harris, A. W. (1970) Mouse myelomas and lymphomas in culture. *Exp. Cell Res.* 60, 61-77.
- Jacq, B. (1981) Sequence homologies between eukaryotic 5,8S rRNA and the 5' end of prokaryotic 23S rRNA: evidences for a common evolutionary origin. *Nucleic Acids Res.* 9, 2913-2932.
- Karagyozov, L. K., Stoyanova B. B. & Hadjiolov, A. A. (1980) Effect of Cycloheximide on the *in vivo* and *in vitro* synthesis of ribosomal RNA in rat liver. *Biochim. Biophys. Acta* 607, 295-303.
- Kay, J. E., Leventhal, B. G. & Cooper, H. L. (1969) Effects of inhibition of ribosomal RNA synthesis on the stimulation of lymphocytes by Phytohaemagglutinin. *Exp. Cell Res.* 54, 94-100.
- Khan, M. S. N., Salim, M. & Maden, B. E. H. (1978) Extensive homologies between the methylated nucleotide sequences in several vertebrate ribosomal ribonucleic acids. *Biochem. J.* 169, 531-542.
- Klagsbrun, M. (1973) An evolutionary study of the methylation of transfer and ribosomal ribonucleic acid in prokaryote and eukaryote organisms. *J. Biol. Chem.* 248, 2612-2620.

- Kominami, R., Hamada, H., Fujii-Kuriyama, Y. & Muramatsu, M. (1978) 5'-terminal processing of ribosomal 28S RNA. *Biochemistry* 17, 3965-3970.
- Koshiba, K., Thirumalachary, C., Daskal, Y. & Busch, H. (1971) Ultrastructural and biochemical studies on ribonucleoprotein particles from isolated nucleoli of thioacetamide-treated rat liver. *Exp. Cell Res.* 68, 235-246.
- Kumar, A. & Warner, J. R. (1972) Characterization of ribosomal precursor particles from HeLa cell nucleoli. *J. Mol. Biol.* 63, 233-246.
- Kumar, A. & Wu, R. S. (1973) Role of ribosomal RNA transcription in ribosome processing in HeLa cells. *J. Mol. Biol.* 80, 265-276.
- Laskey, R. A. (1984) Radioisotope detection by fluorography and intensifying screens. *Firmenschrift der Firma Amersham Buchler (Braunschweig)*, Review 23.
- Laskey, R. A. & Mills, A. D. (1977) Enhanced autoradiographic detection of ^{32}P and ^{125}I using intensifying screens and hypersensitized film. *FEBS Lett.* 82, 314-316.
- Lazáry, S. & Stähelin, H. (1968) Immunosuppressive and specific antimitotic effects of Ovalicin. *Experientia* 24, 1171-1173.
- Lehrach, H., Diamond, D., Wozney, J. M. & Boedtker, H. (1977) RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry* 16, 4743-4751.
- Lerner, M. R. & Steitz, J. A. (1979) Antibodies to small nuclear RNAs complexed with proteins are produced by patients with systemic lupus erythematosus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 5495-5499.
- Lipp, M. (1981) Wirkung von Interferon auf die Genexpression von Herpes-Simplex-Virus und Epstein-Barr-Virus in lytisch infizierten und transformierten Zellen. Dissertation, Fakultät für Biologie, Albert Ludwigs-Universität, Freiburg i.Br..
- Loehning, U. E. (1968) Molecular weights of ribosomal RNA in relation to evolution. *J. Mol. Biol.* 38, 355-365.
- Lönn, U. & Edström, J.-E. (1977) Movements and associations of ribosomal subunits in a secretory cell during growth inhibition by starvation. *J. Cell Biol.* 73, 696-704.
- Long, E. O. & Dawid, I. B. (1980) Repeated genes in eukaryotes. *Annu. Rev. Biochem.* 49, 727-764.

- Luck, D. N. & Hamilton, T. H. (1972) Early Estrogen action: stimulation of the metabolism of high molecular weight and ribosomal RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**, 157-161.
- Maden, B. E. H. (1971) The structure and formation of ribosomes in animal cells. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **22**, 129-177.
- Maden, B. E. H. (1976) Ribosomal precursor RNA and ribosome formation in eukaryotes. *TIBS* **1**, 196-199.
- Maden, B. E. H., Khan, M. S. N., Hughes, D. G. & Goddard, J. P. (1977) Inside 45S ribonucleic acid. *Biochem. Soc. Symp.* **42**, 165-179.
- Maden, B. E. H. & Salim, M. (1974) The methylated nucleotide sequences in HeLa cell ribosomal RNA and its precursors. *J. Mol. Biol.* **88**, 133-164.
- Maden, B. E. H., Salim, M. & Summers, D. F. (1972) Maturation pathway for ribosomal RNA in the HeLa cell nucleolus. *Nature (London), New Biol.* **237**, 5-9.
- Maden, B. E. H., Vaughan, M. H., Warner, J. R. & Darnell, J. E. (1969) Effects of valine deprivation on ribosome formation in HeLa cells. *J. Mol. Biol.* **45**, 265-275.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. & Sambrook, J. (1982) Molecular cloning - a laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory, New York.
- Maxwell, I. H., Maxwell, F. & Hahn, W. E. (1977) Removal of RNase activity from DNase by affinity chromatography on agarose-coupled aminophenylphosphoryl-uridin-2'(3')-phosphate. *Nucleic Acids Res.* **4**, 241-246.
- McCorkindale, N. J. & Sime, J. G. (1961) The configuration of Fumagillin. *Proc. Chem. Soc., London* **1961**, 331.
- Miller, K. G. & Sollner-Webb, B. (1981) Transcription of mouse rRNA genes by RNA polymerase I: *in vitro* and *in vivo* initiation and processing sites. *Cell* **27**, 165-174.
- Nazar, R. N. (1980) A 5,8S rRNA-like sequence in prokaryotic 23S rRNA. *FEBS Lett.* **119**, 212-214.
- Nozoe, S., Kobayashi, H. & Morisaki, N. (1976) Isolation of β -trans-Bergamotene from *Aspergillus fumigatus*, a Fumagillin producing fungi. *Tetrahedron Lett.* **1976** (50), 4625-4626.

- Obara, M., Hirano, H. & Higashi, K. (1982) Purification and characterisation of nucleolar ribonucleic acid methylase from Ehrlich ascites tumor cells of mice. *Biochemistry* 21, 1374-1380.
- Pace, N. R., Walker, T. A. & Schroeder, E. (1977) Structure of the 5,8S RNA component of the 5,8S-28S ribosomal RNA junction complex. *Biochemistry* 16, 5321-5328.
- Paul, J. (1980) Zell- und Gewebekulturen. De Gruyter, Berlin, New York.
- Peacock, A. C. & Dingman, C. W. (1967) Resolution of multiple ribonucleic acid species by polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochemistry* 6, 1818-1827.
- Pene, J. J., Knight Jr, E. & Darnell Jr, J. E. (1968) Characterization of a new low molecular weight RNA in HeLa cell ribosomes. *J. Mol. Biol.* 33, 609-623.
- Penman, S. (1966) RNA metabolism in the HeLa cell nucleus. *J. Mol. Biol.* 17, 117-130.
- Penman, S., Smith, I. & Holtzman, E. (1966) Ribosomal RNA synthesis and processing in a particulate site in the HeLa cell nucleus. *Science* 154, 786-789.
- Perry, R. P. & Kelley, D. E. (1972) The production of ribosomal RNA from high molecular weight precursors. *J. Mol. Biol.* 70, 265-279.
- Perry, R. P. (1976) Processing of RNA. *Annu. Rev. Biochem.* 45, 605-629.
- Peters, M. A., Walker, T. A. & Pace, N. R. (1982) Independent binding sites in mouse 5,8S ribosomal ribonucleic acid for 28S ribosomal ribonucleic acid. *Biochemistry* 21, 2329-2335.
- Prestayko, A. W., Tonato, M. & Busch, H. (1970) Low molecular weight RNA associated with 28 S nucleolar RNA. *J. Mol. Biol.* 47, 505-515.
- Purtell, M. J. & Anthony, D. D. (1975) Changes in ribosomal RNA processing paths in resting and phytohemagglutinin-stimulated guinea pig lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 3315-3319.
- Puskas, R. S., Manley, N. R., Wallace, D. M. & Berger, S. L. (1982) Effect of ribonucleoside-vanadyl complexes on enzyme-catalyzed reactions central to recombinant deoxyribonucleic acid technology. *Biochemistry* 21, 4602-4608.

- Reddy, R. & Busch, H. (1983) Small nuclear RNAs and RNA processing. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 30, 127-162.
- Reddy, R., Li, W.-Y., Henning, D., Choi, Y. C., Nohga, K. & Busch, H. (1981) Characterization and subcellular localization of 7-8 S RNAs of Novikoff Hepatoma. *J. Biol. Chem.* 256, 8452-8457.
- Reddy, R., Rothblum, L. I., Subrahmanyam, C. S., Liu, M.-H., Henning, D., Cassidy, B. & Busch, H. (1983) The nucleotide sequence of 8 S RNA bound to preribosomal RNA of Novikoff Hepatoma. The 5'-end of 8 S RNA is 5,8 S RNA. *J. Biol. Chem.* 258, 584-589.
- Ro-Choi, T. S., Moriyama, Y. Choi, Y. C. & Busch, H. (1970) Isolation and purification of a nuclear 4,5 S ribonucleic acid of the Novikoff Hepatoma. *J. Biol. Chem.* 245, 1970-1977.
- Rottman, F., Friderici, K., Comstock, P. & Khan, M. K. (1974) Influence of 2'-O-alkylation on the structure of single-stranded polynucleotides and the stability of 2'-O-alkylated polynucleotide complexes. *Biochemistry* 13, 2762-2771.
- Sassa, T., Kaise, H. & Munakata, K. (1970) The structure of Graphinone. *Agric. Biol. Chem.* 34(4), 649-651.
- Sassa, T., Kaise, H., Ogawa, Y. & Munakata, K. (1979) Isolation of a new lettuce seed germination stimulant. *Nature (London)* 222, 773-774.
- Scherrer, K. & Darnell, J. E. (1962) Sedimentation characteristics of rapidly labelled RNA from HeLa cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 7, 486-490.
- Scherrer, K., Latham, H. & Darnell, J. E. (1963) Demonstration of an unstable RNA and of a precursor to ribosomal RNA in HeLa cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 49, 240-248.
- Shephard, J. & Maden, B. E. H. (1972) Ribosome assembly in HeLa cells. *Nature (London)* 236, 211-214.
- Sigg, H. P. & Weber, H. P. (1968) Isolierung und Strukturaufklärung von Ovalicin. *Helv. Chim. Acta* 51, 1395-1408.
- Soeiro, R., Vaughan, M. H. & Darnell, J. E. (1968) The effect of puromycin on intranuclear steps in ribosome biogenesis. *J. Cell Biol.* 36, 91-101.
- Sören, L. & Biberfeld, P. (1973) Quantitative studies on RNA accumulation in human PHA-stimulated lymphocytes during blast transformation. *Exp. Cell Res.* 79, 359-367.

- Sommerville, J. (1985) Organizing the nucleolus.
Nature (London) **318**, 410-411.
- Soprano, K. J., Dev, V. G., Croce, C. M. & Baserga, R. (1979) Reactivation of silent rRNA genes by simian virus 40 in human-mouse hybrid cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**, 3885-3889.
- Stoyanova, B. B. & Hadjiolov, A. A. (1979) Alterations in the processing of rat-liver ribosomal RNA caused by Cycloheximide inhibition of protein synthesis.
Eur. J. Biochem. **96**, 349-356.
- Tanabe, M. & Suzuki, K. T. (1974) Biosynthetic studies with carbon-13: incorporation pattern of 1,2-¹³C-acetate into the fungal sesquiterpene Ovalicin.
Tetrahedron Lett. **1974** (49-50), 4417-4420.
- Tomcsányi, T. & Apirion, D. (1985) Processing enzyme ribonuclease E specifically cleaves RNA I, an inhibitor of primer formation in plasmid DNA synthesis.
J. Mol. Biol. **185**, 713-720.
- Turner, J. R. & Tarbell, D. S. (1962) The stereochemistry of Fumagillin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **48**, 733-735.
- Urano, Y., Kominami, R., Mishima, Y. & Muramatsu, M. (1980) The nucleotide sequence of the putative transcription initiation site of a cloned ribosomal RNA gene of the mouse. *Nucleic Acids Res.* **8**, 6043-6058.
- Vaughan Jr, M. H., Soeiro, R., Warner, J. R. & Darnell, J. E. (1967) The effects of methionine deprivation on ribosome synthesis in HeLa cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **58**, 1527-1534.
- Walker, T. A., Johnson, K. D., Olsen, G. J., Peters, M. A. & Pace, N. R. (1982) Enzymatic and chemical structure mapping of mouse 28S ribosomal ribonucleic acid contacts in 5,8S ribosomal ribonucleic acid.
Biochemistry **21**, 2320-2329.
- Walker, T. A. & Pace, N. R. (1983) 5,8S ribosomal RNA.
Cell **33**, 320-322.
- Walter, P. & Blobel, G. (1982) Signal recognition particle contains a 7S RNA essential for protein translocation across the endoplasmatic reticulum.
Nature (London) **299**, 691-698.
- Warner, J. R. & Soeiro, R. (1967) Nascent ribosomes from HeLa cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **52**, 1984-1990.
- Weinberg, R. A., Loening, U., Willems, M. & Penman, S. (1967) Acrylamide gel electrophoresis of HeLa cell nucleolar RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **58**, 1088-1095.

- Weinberg, R. A. & Penman, S. (1968) Small molecular weight monodisperse nuclear RNA. *J. Mol. Biol.* 38, 289-304.
- Weinberg, R. A. & Penman, S. (1970) Processing of 45S nucleolar RNA. *J. Mol. Biol.* 47, 169-178.
- Weiner, E. (1976) Über die immunsuppressive Wirkung des Sesquiterpens Ovalicin auf Lymphocyten. Dissertation, Naturwissenschaftliche Fakultät, Julius Maximilians-Universität Würzburg.
- Wellauer, P. K. & Dawid, I. B. (1973) Secondary structure maps of RNA: processing of HeLa ribosomal RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 2827-2831.
- Wellauer, P. K. & David, I. B. (1975) Structure and processing of ribosomal RNA: a comparative electron microscopic study in three animals. *Brookhaven Symp. Biol.* 26, 214-223.
- Wellauer, P. K., Dawid, I. B., Kelley, D. E. & Perry, R. P. (1974) Secondary structure maps of ribosomal RNA. II. Processing of mouse L-cell ribosomal RNA and variations in the processing pathway. *J. Mol. Biol.* 89, 397-407.
- Willems, M., Penman, M. & Penman, S. (1969) The regulation of RNA synthesis and processing in the nucleolus during inhibition of protein synthesis. *J. Cell Biol.* 41, 177-187.
- Winicov, I. (1976) Alternate temporal order in ribosomal RNA maturation. *J. Mol. Biol.* 100, 141-155.
- Winicov, I. & Perry, R. P. (1975) Enzymological aspects of processing of mammalian rRNA. *Brookhaven Symp. Biol.* 26, 201-213.
- Wolf, S. F. & Schlessinger, D. (1977) Nuclear metabolism of ribosomal RNA in growing, methionine-limited, and ethionine-treated HeLa cells. *Biochemistry* 16, 2783-2791.
- Wool, I. G. (1979) The structure and function of eukaryotic ribosomes. *Annu. Rev. Biochem.* 48, 719-754.
- Wunderlich, F. (1981) Nucleocytoplasmic transport of ribosomal subparticles: interplay with the nuclear envelope. In *The Cell Nucleus* (Busch, H., ed.), vol. IX, pp. 249 - 288, Academic Press, New York.
- Yu, F.-L. & Feigelson, P. (1972) The rapid turnover of RNA polymerase of rat liver nucleolus, and of its messenger RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 2833-2837.

- Zieve, G. & Penman, S. (1976) Small RNA species of the HeLa cell: metabolism and subcellular localization. *Cell* **8**, 19-31.
- Zimmerman, E. F. & Holler, B. W. (1967) Methylation of 45 S ribosomal RNA precursor in HeLa cells. *J. Mol. Biol.* **23**, 149-161.
- Zimmerman, S. B. & Sandeen, G. (1966) The ribonuclease activity of crystallized pancreatic deoxyribonuclease. *Anal. Biochem.* **14**, 269-277.
- Zimmermann, W. (1979) Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus des immunsuppressiven Sesquiterpens Ovalicin. Dissertation, Fakultät für Chemie und Pharmazie, Ludwig Maximilians Universität München.
- Zimmermann, W. A. & Hartmann, G. R. (1980) On the mode of action of Ovalicin, an extremely potent cell-type specific inhibitor of proliferation. In Nucleic Acids and Proteins, the Proceedings of a Symposium on Nucleic Acids and Proteins (Zhao-wen, S., ed.), pp. 643 - 653, Science Press, Beijing, China.
- Zimmermann, W. A. & Hartmann, G. R. (1981) On the mode of action of the immunosuppressive sesquiterpen Ovalicin. *Eur. J. Biochem.* **118**, 143-150.

ABKÜRZUNGEN

BSS	Hank's <u>B</u> alanced <u>S</u> alt <u>S</u> olution (S. 16)
cpm	counts per minute
ddH ₂ O	doppelt <u>d</u> estilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's <u>M</u> odified <u>E</u> agle <u>M</u> edium (S. 15)
DMSO	<u>D</u> imethylsulfoxid
DNase	<u>D</u> esoxyribonuklease
DNase Puffer	Puffer für Desoxyribonukleaseabbau (S. 17)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ETS	externer <u>t</u> ranskribierter <u>s</u> pacer
hnRNA	<u>h</u> eteronukleare <u>R</u> NA
ITS	interner <u>t</u> ranskribierter <u>s</u> pacer
MOPS	<u>M</u> orpholinopropansulfonsäure (S. 14)
MW	"Molekulargewicht", relative Molmasse
NP 40	Nonidet P-40 (nichtionisches Detergens)
OD	Optische <u>D</u> ichte bei 260 nm
pre rRNA	Vorläufer ribosomaler RNA
RNase	<u>R</u> ibonuklease
RNP	<u>R</u> ibonukleoproteinpartikel
s	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
snRNA	<u>s</u> mall <u>n</u> uclear <u>R</u> NA, kleine KernRNA
TEN Puffer	<u>T</u> ris· <u>E</u> dta· <u>N</u> aCl Puffer (S. 17)
TE Sarkosyl	<u>T</u> ris· <u>E</u> dta·Sarkosyl Puffer (S. 18)
T7 DNA	DNA des Bakteriophagen T7
Upm	<u>U</u> mdrehungen pro <u>M</u> inute

Da seit kurzem bekannt ist, daß 28S RNA im Zellkern nicht mit 28S rRNA im Cytoplasma identisch ist (Hadjiolova *et al.*, 1984a), wurden in Analogie dazu alle ribosomalen RNAs und ihre Vorläufermoleküle im Zellkern grundsätzlich nur mit "RNA" - oder mit "pre rRNA" (= Vorläufer ribosomaler RNA) - bezeichnet. Mit "rRNA" wurden nur die reifen ribosomalen RNAs im Cytoplasma bezeichnet.

VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN, FIGUREN UND TABELLEN

Seite

Abb. 1:	Gelelektrophorese isolierter KernRNA aus S49.1 Zellen in einem 0,8% Agarose-2,2M Formaldehydgel	37
Abb. 2:	Fluorographie der Gelelektrophorese von kleiner KernRNA aus S49.1 Zellen nach 60 min Pulsmarkierung mit [^3H]Uridin	78
Abb. 3:	Fluorographie cytoplasmatischer RNA aus S49.1-Zellen nach 60 min Pulsmarkierung mit [^3H]Uridin nach Gelelektrophorese	109
Fig. 1:	"Mäuse-L Zell Weg" des Prozessierens ribosomaler RNA	8
Fig. 2:	"HeLa Zell Weg" des Prozessierens ribosomaler RNA	10
Fig. 3:	Verhältnis des dekadischen Logarithmus der Svedbergkonstanten ribosomaler VorläuferRNAs zu ihrer Wanderungsstrecke in einem 0,8% Agarose-2,2M Formaldehydgel	38
Fig. 4:	Einfluß von Ovalicin auf das Wachstum von S49.1 Zellen	46
Fig. 5:	Gelelektrophorese von KernRNA aus ovalicin-behandelten S49.1 Zellen nach 20 min Pulsmarkierung mit [methyl- ^3H]Methionin	60
Fig. 6:	Gelelektrophorese von KernRNA aus un-behandelten Kontrollzellen nach 20 min Pulsmarkierung mit [methyl- ^3H]Methionin	61
Fig. 7:	Gelelektrophorese von KernRNA aus ovalicin-behandelten S49.1 Zellen nach 30 min Pulsmarkierung mit [methyl- ^3H]Methionin	66
Fig. 8:	Gelelektrophorese von KernRNA aus un-behandelten Kontrollzellen nach 30 min Pulsmarkierung mit [methyl- ^3H]Methionin	67
Fig. 9:	Gelelektrophorese von KernRNA aus ovalicin-behandelten S49.1 Zellen nach 40 min Pulsmarkierung mit [methyl- ^3H]Methionin	72

Fig. 10:	Gelelektrophorese von KernRNA aus un- behandelten Kontrollzellen nach 40 min Pulsmarkierung mit [methyl- ^3H]Methionin	73
Fig. 11:	Densitometrische Auswertung der Fluorographie der Gelelektrophorese von kleiner KernRNA aus S49.1 Zellen nach 60 min Pulsmarkierung mit [^3H]Uridin	79
Fig. 12:	Densitometrische Auswertung einer Fluorographie der Gelelektrophorese von kleiner KernRNA aus S49.1 Zellen nach 90 min Pulsmarkierung mit [^3H]Uridin	83
Fig. 13:	Gelelektrophorese von KernRNA aus ovalicin- behandelten S49.1-Zellen nach 60 min Pulsmarkierung mit [methyl- ^3H]Methionin	88
Fig. 14:	Gelelektrophorese von KernRNA aus unbehandelten Kontrollzellen nach 60 min Pulsmarkierung mit [methyl- ^3H]Methionin	89
Fig. 15:	32 - 28S Bereich im Gel fraktionierter KernRNA aus ovalicinbeh.Zellen und unbeh. Kontrollzellen	91
Fig. 16:	Gelelektrophorese cytoplasmatischer RNA aus ovalicinbehandelten S49.1-Zellen nach 60 min Pulsmarkierung mit [methyl- ^3H]Methionin	94
Fig. 17:	Gelelektrophorese cytoplasmatischer RNA aus unbehandelten Kontrollzellen nach 60 min Pulsmarkierung mit [methyl- ^3H]Methionin	95
Fig. 18:	Gelelektrophorese von KernRNA aus ovalicinbe- handelten S49.1-Zellen nach 90 min Pulsmarkierung mit [methyl- ^3H]Methionin	98
Fig. 19:	Gelelektrophorese von KernRNA aus unbehan- delten Kontrollzellen nach 90 min Puls- markierung mit [methyl- ^3H]Methionin	99
Fig. 20:	Gelelektrophorese cytoplasmatischer RNA aus ovalicinbehandelten S49.1-Zellen nach 90 min Pulsmarkierung mit [methyl- ^3H]Methionin	102
Fig. 21:	Gelelektrophorese cytoplasmatischer RNA aus unbehandelten Kontrollzellen nach 90 min Pulsmarkierung mit [methyl- ^3H]Methionin	103
Fig. 22:	Gelelektrophorese cytoplasmatischer RNA aus ovalicinbehandelten S49.1-Zellen nach 60 min Pulsmarkierung mit [^3H]Uridin	106
Fig. 23:	Gelelektrophorese cytoplasmatischer RNA aus unbehandelten Kontrollzellen nach 60 min Pulsmarkierung mit [^3H]Uridin	107

Fig. 24:	Gelelektrophorese cytoplasmatischer RNA aus S49.1 Zellen nach 90 min Pulsmarkierung mit [^3H]Uridin	111
Fig. 25:	Gelelektrophorese von KernRNA aus ovalicin-behandelten S49.1 Zellen nach 30 min Pulsmarkierung mit [^3H]Uridin	116
Fig. 26:	Gelelektrophorese von KernRNA aus unbehandelten Kontrollzellen nach 30 min Pulsmarkierung mit [^3H]Uridin	117
Fig. 27:	Gelelektrophorese von KernRNA aus ovalicin-behandelten S49.1-Zellen nach 60 min Pulsmarkierung mit [^3H]Uridin	120
Fig. 28:	Gelelektrophorese von KernRNA aus unbehandelten Kontrollzellen nach 60 min Pulsmarkierung mit [^3H]Uridin	121
Fig. 29:	Postulierte Hemmung des ersten nukleolytischen Prozessierungsschrittes von 45S-zu 41S RNA durch Ovalicin	135
Fig. 30:	Ein alternativer Prozessierungsweg für 45S preRNA	137
Fig. 31:	Ein zweiter alternativer Prozessierungsweg für 45S preRNA	138
Tab. 1:	Gehalt ribosomaler RNAs und VorläuferRNAs in Rattenleber-Zellkernen	40
Tab. 2:	Einfluß von Ovalicin auf den RNA Gehalt von S49.1 Zellkernen	48
Tab. 3:	Einfluß von Ovalicin auf die RNA Syntheserate von S49.1 Zellen	49
Tab. 4:	Einfluß von Ovalicin auf die spezifische Radioaktivität von KernRNA aus S49.1 Zellen	51
Tab. 5:	Einfluß von Ovalicin auf die Methylierungsgeschwindigkeit methylmarkierter S49.1 KernRNA	53
Tab. 6:	Einfluß von Ovalicin auf die spezifische Radioaktivität methylmarkierter KernRNA aus S49.1 Zellen	54
Tab. 7:	Aufnahme von radioaktivem Uridin aus dem Kulturmedium	56
Tab. 8:	Aufnahme von radioaktivem Methionin aus dem Kulturmedium	58

Tab. 9:	Eingebaute Radioaktivität in ribosomale RNA nach 30 min Markierung mit [methyl- ^3H]Methionin im Zellkern	65
Tab. 10:	Eingebaute Radioaktivität in ribosomale RNA nach 30 min Markierung mit [methyl- ^3H]Methionin im Zellkern dividiert durch die optische Dichte der auf das Gel aufgetragenen Gesamt KernRNA	68
Tab. 11:	Eingebaute Radioaktivität in ribosomale RNA nach 40 min Markierung mit [methyl- ^3H]Methionin im Zellkern	71
Tab. 12:	Kettenlängen einiger snRNAs	77
Tab. 13:	Eingebaute Radioaktivität in ribosomale RNA des Zellkerns nach 60 min Markierung mit [methyl- ^3H]Methionin	90
Tab. 14:	Eingebaute Radioaktivität in ribosomale RNA nach 90 min Markierung mit [methyl- ^3H]Methionin im Cytoplasma	101
Tab. 15:	Eingebaute Radioaktivität in ribosomale RNA nach 60 min Markierung mit [^3H]Uridin im Cytoplasma	105
Tab. 16:	Eingebaute Radioaktivität in ribosomale RNA nach 90 min Markierung mit [^3H]Uridin im Cytoplasma	110
Tab. 17:	Eingebaute Radioaktivität in ribosomale RNA nach 60 min Markierung mit [^3H]Uridin im Zellkern	119

LEBENS LAUF

Name	Hannes Diersch
Geburtsdatum	9. Juni 1956
Geburtsort	München
Familienstand	verheiratet
Staatsangehörigkeit	deutsch
Eltern	Johannes Diersch, Dipl.- Ing. Ilse Diersch, geb. Jaschhof

Schulausbildung

1962 - 1966	Grundschule an der Werdenfels- straße in München
1966 - 1975	Erasmus Grasser Gymnasium in München
21. 6. 1975	Abitur (mathematisch natur- wissenschaftlicher Zweig)
1975 - 1976	Grundwehrdienst

Studium

1976 - 1986	Chemiestudium an der Ludwig- Maximilians Universität München
4. 5. 1979	Diplomvorprüfung
30. 7. 1981	mündliche Diplomhauptprüfung

Okt. 1981 - Sept. 1982

Diplomarbeit "Einfluß des
Sesquiterpens Ovalicin auf den
Ribosomengehalt von S49.1-
Lymphomazellen" am Institut für
Biochemie der LMU München bei
Prof. Dr. G. R. Hartmann

30. 9. 1982

Abschluß der Diplomhauptprüfung
in Chemie

Okt. 1982 - Aug. 1986

Doktorarbeit am Institut für
Biochemie der LMU München bei
Prof. Dr. G. R. Hartmann

Teile dieser Dissertation wurden auf dem Second European Congress On Cell Biology (1986) in Budapest als Poster vorgestellt und veröffentlicht in:

Diersch, H. & Hartmann, G. R. (1986) The influence of the immunosuppressive sesquiterpene Ovalicin on the metabolism of ribosomal RNA.
Acta Biol. Acad. Sci. Hung. 37, Suppl. 38.

